

INAUGURAL – DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich - Mathematischen
Gesamtfakultät
der Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Dipl.-Phys. Steffen Görke
aus Ellwangen

Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.2015

Einfluss von Entfaltung und Aggregation auf den ^1H -Magnetisierungstransfer zwischen Proteinen und freiem Wasser

Gutachter: Prof. Dr. Peter Bachert
Prof. Dr. Michael Hausmann

Einfluss von Entfaltung und Aggregation auf den ^1H -Magnetisierungstransfer zwischen Proteinen und freiem Wasser

Die Magnetresonanztomographie (MRT) verwendet das Signal von Protonen in freiem Wasser zur nicht-invasiven Darstellung anatomischer Strukturen in lebendem Gewebe. Darüber hinaus können organische Verbindungen niedriger Konzentration mittels der *Chemical Exchange Saturation Transfer* (CEST)-Bildgebung indirekt im Wassersignal detektiert werden. Diese spektroskopische Bildgebungstechnik nutzt den Magnetisierungstransfer zwischen Wasserprotonen und chemisch austauschenden Protonen in Biomolekülen um eine Signalverstärkung zu erzielen. In der vorliegenden Arbeit wurde die CEST-Methode dazu verwendet, die Signale von Proteinen und deren Korrelation mit strukturellen und konformativen Änderungen zu untersuchen. Ein CEST-Kontrast mit der Möglichkeit zur Detektion anomaler Faltungszustände von Proteinen ist von besonderem Interesse in Bezug auf die Protein-Denaturierung als Anzeichen für übermäßige Belastungen, Erkrankung und Alterung. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Protein-Entfaltung und -Aggregation zu charakteristischen Änderungen der CEST-Signale führt, welche eine Differenzierung dieser Denaturierungsprozesse ermöglichen. Der Ursprung der Signaländerungen konnte mit Hilfe quantitativer Analysen der Austauschprozesse identifiziert werden. In Annäherung an das komplexe Zusammenspiel von Proteinen in einem lebenden Organismus, wurden die entwickelten Methoden in Lysaten getestet. Die gewonnenen Erkenntnisse konnten dazu verwendet werden, einen *Denatured Protein Contrast* (DPC) zu entwickeln, welcher die Darstellung von Gehirntumoren in Patienten ermöglicht. Die Korrelation dieses Kontrastes mit den Tumor-Arealen veranschaulicht die biophysikalische und biomedizinische Wertigkeit dieser Ergebnisse.

Effect of Unfolding and Aggregation on the ^1H -Magnetization Transfer between Proteins and Free Water

Magnetic Resonance Imaging (MRI) employs the signal of protons in free water to non-invasively obtain anatomical information from living tissue. Moreover, organic compounds low in concentration can be indirectly detected via the water signal by Chemical Exchange Saturation Transfer (CEST) imaging. This spectroscopic imaging technique uses the magnetization transfer between water protons and chemically exchanging protons in biomolecules to generate a signal amplification. In this study, the CEST method was applied to investigate the signals of proteins and their correlation with structural and conformational changes. A CEST contrast with the potential to detect aberrant protein folding states is of particular interest for protein denaturation as a marker for stress, disease, and ageing. It was demonstrated in this work that protein unfolding and aggregation leads to characteristic changes in CEST signals allowing discrimination of these denaturation processes. The origin of the signal changes could be identified by means of quantitative analyses of the exchange processes. On the course to the complex interplay of proteins in a living organism, application of the derived method was tested in lysates. Finally, the insights gained led to a definition of a Denatured Protein Contrast (DPC) which enabled to image the brain tumors of patients. The correlation of this contrast with the tumorous regions demonstrates the biophysical and biomedical value of this study.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | v |
| 1 Einleitung | 1 |
| 2 Grundlagen | 5 |
| 2.1 Grundlagen der NMR | 5 |
| 2.1.1 Atomkerne im Magnetfeld | 5 |
| 2.1.2 Die makroskopische Magnetisierung | 6 |
| 2.1.3 Bloch-Gleichungen und Relaxation | 7 |
| 2.1.4 Magnetresonanz-Signal | 9 |
| 2.1.5 Chemische Verschiebung | 10 |
| 2.2 Grundlagen des Magnetisierungstrfers | 11 |
| 2.2.1 Chemischer Austausch (CA) | 11 |
| 2.2.2 Dipolare Wechselwirkungen | 13 |
| 2.2.3 Exchange-relayed NOE (rNOE) | 16 |
| 2.2.4 Semi-solid Magnetization Transfer (ssMT) | 17 |
| 2.3 Das Phänomen CEST | 19 |
| 2.3.1 Das Sättigungstrfer-Experiment | 19 |
| 2.3.2 Endogene CEST-Signale | 20 |
| 2.3.3 CEST-Theorie | 21 |
| 2.3.4 Isolierte Sättigungstrfer-Effekte (AREX-Signal) | 27 |
| 2.4 Proteine | 29 |
| 2.4.1 Aufbau und Struktur von Proteinen | 29 |
| 2.4.2 Denaturierung | 32 |
| 2.4.3 CEST-Effekte von Proteinen | 32 |
| 3 Material und Methoden | 35 |
| 3.1 NMR-Messsysteme | 35 |
| 3.1.1 NMR-Spektrometer | 35 |
| 3.1.2 Ganzkörper-MR-Tomograph | 36 |
| 3.2 Aufnahme von MR-Daten | 37 |
| 3.2.1 Z-Spektren | 37 |
| 3.2.2 T_1 -Bestimmung | 38 |
| 3.2.3 ^1H -NMR-Spektren | 39 |
| 3.2.4 WEX-Spektren | 39 |
| 3.3 Auswertung von MR-Daten | 40 |
| 3.3.1 AREX-Spektren | 40 |
| 3.3.2 AREX-Denaturierungskurven | 44 |
| 3.3.3 Quantitative Bestimmung von k_{sw} und f_s | 44 |
| 3.3.4 afAREX-Signal | 45 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 3.3.5 | WEX-Signal | 45 |
| 3.4 | Fluoreszenz-Spektroskopie | 46 |
| 3.4.1 | Pearson-Korrelationsanalyse | 46 |
| 3.5 | Modellsysteme | 47 |
| 3.5.1 | Bovine Serum Albumin (BSA) | 47 |
| 3.5.2 | Huntingtin (HTT)-Protein | 48 |
| 3.5.3 | β -Amyloid ($A\beta$) | 49 |
| 3.5.4 | Hefezellen-Lysat | 49 |
| 3.5.5 | Tierhirn-Homogenisat | 53 |
| 4 | Ergebnisse | 55 |
| 4.1 | Entfaltung von BSA | 55 |
| 4.1.1 | Isolierte Sättigungstransfer-Effekte | 55 |
| 4.1.2 | CEST-Signaländerungen unter Entfaltung | 56 |
| 4.1.3 | Ursprung der CEST-Signaländerungen unter Protein-Entfaltung | 63 |
| 4.2 | Aggregation von Monomeren | 67 |
| 4.2.1 | Huntingtin (HTT)-Protein | 67 |
| 4.2.2 | β -Amyloid ($A\beta$) | 69 |
| 4.3 | Denaturierung von Hefezellen-Lysaten | 72 |
| 4.3.1 | Das Hefezellen-Lysat | 73 |
| 4.3.2 | Denaturierung mittels Hitzeschock | 75 |
| 4.3.3 | Denaturierung mittels SDS | 77 |
| 4.4 | CEST-Kontrast denaturierter Proteine | 80 |
| 4.4.1 | Denatured Protein Contrast (DPC) | 80 |
| 4.4.2 | Applikation <i>in vivo</i> | 81 |
| 5 | Diskussion | 85 |
| 5.1 | Einfluss der Denaturierung auf die CEST-Effekte von Proteinen | 85 |
| 5.1.1 | Isolierte Sättigungstransfer-Effekte | 85 |
| 5.1.2 | Signatur der Protein-Entfaltung | 86 |
| 5.1.3 | Signatur der Protein-Aggregation | 87 |
| 5.1.4 | Ursprung der CEST-Signaländerungen unter Denaturierung | 87 |
| 5.2 | CEST-Kontrast denaturierter Proteine <i>in vivo</i> | 90 |
| 5.2.1 | Detektion von Protein <i>in vivo</i> | 90 |
| 5.2.2 | Denaturierung von Hefezellen-Lysaten | 90 |
| 5.2.3 | DPC von Hirntumoren | 92 |
| 5.3 | Ausblick | 95 |
| 5.3.1 | Detektion der Protein-Denaturierung mittels CEST <i>in vivo</i> | 95 |
| 5.3.2 | Zweidimensionale CEST-Spektroskopie | 95 |
| 6 | Zusammenfassung | 99 |
| A | Anhang | 101 |
| A.1 | Messparameter | 101 |
| A.2 | Proteine | 113 |
| | Abbildungsverzeichnis | 117 |

| | |
|-----------------------------|------------|
| Tabellenverzeichnis | 119 |
| Literaturverzeichnis | 121 |
| Publikationsliste | 129 |
| Danksagung | 133 |
| Erklärung | 135 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|---|
| α | Sättigungseffizienz |
| $\Delta\omega$ | Frequenzoffset relativ zum Wassersignal |
| \mathcal{L} | Lorentz-förmige Funktion |
| ω_R | Resonanzfrequenz |
| B_0 | statische Magnetfeldstärke |
| B_1 | Amplitude des RF-Feldes |
| f | Protonen-Verhältnis |
| k | Austauschrate |
| M | Magnetisierung |
| T | Temperatur |
| T_1 | longitudinale Relaxationszeit |
| T_2 | transversale Relaxationszeit |
| t_{sat} | Sättigungsdauer |
| ^1H | Atomkern des Wasserstoffatoms |
| $A\beta$ | β -Amyloid |
| afAREX | aromatic-rNOE-free AREX |
| AREX | Apparent Exchange-dependent Relaxation |
| BSA | Bovine Serum Albumin |
| CA | Chemischer Austausch |
| CEST | Chemical Exchange Saturation Transfer |
| DPC | Denatured Protein Contrast |
| DS | Direkte Wassersättigung |
| FID | freier Induktionszerfall |
| FL | Fluoreszenz |
| FT | Fourier-Transformation |
| GST | Glutathion-S-Transferase |
| HTT | Huntingtin |
| MR | Magnetresonanz |
| MRS | Magnetresonanz-Spektroskopie |
| MRT | Magnetresonanz-Tomographie |
| NMR | Nuclear Magnetic Resonance |
| NOE | Kern-Overhauser-Effekt |
| PSP | PreScission Protease |
| RF | Radiofrequenz-Feld |
| rNOE | exchange-relayed NOE |
| SDS | Sodium Dodecyl Sulfate |
| ssMT | semi-solid Magnetization Transfer |
| WEX | Water Exchange |
| Z | Z-Spektrum |

1 Einleitung

Nachdem in den 1920er Jahren das quantenmechanische Phänomen des Spins postuliert und experimentell nachgewiesen wurde, entdeckten im Jahre 1946 die Arbeitsgruppen von (Bloch u. a., 1946) und (Purcell u. a., 1946) unabhängig voneinander die kernmagnetische Resonanz (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR) in kondensierter Materie. In den darauffolgenden Jahren entwickelte sich die NMR zu einem bedeutenden Analyseverfahren von Molekülen mit Anwendungen in verschiedenen Bereichen der Physik und vor allem der Chemie. Die Entdeckung einer Dispersion der Resonanzfrequenz in Abhängigkeit von der chemischen Umgebung eines Kernspins (Proctor und Yu, 1950) stellt dabei die Grundlage für die NMR-Spektroskopie (MRS) dar. Das Potential der NMR zur Darstellung der räumlichen Verteilung von Kernspins durch Einführung von Magnetfeldgradienten wurde jedoch erst drei Jahrzehnte später von (Lauterbur, 1973) erkannt. Nach den ersten NMR-Aufnahmen am Menschen Ende der 1970er Jahre hat sich die Magnetresonanztomographie (MRT), die das dominante NMR-Signal von Wasserprotonen in Gewebe nützt, schnell zu einem etablierten Diagnostikverfahren in der Medizin durchgesetzt. Neben dem ausgezeichneten Weichteilkontrast ist ein weiterer Vorteil, dass die MRT im Gegensatz zu anderen bildgebenden Verfahren ohne den Einsatz von ionisierender Strahlung oder Radionukliden auskommt und daher zu keiner Strahlenbelastung des Patienten führt. Den ursprünglichen NMR-Kontrasten mit einer Gewichtung der longitudinalen und transversalen Relaxationszeit (T_1 und T_2) folgten diverse Kontrastmechanismen, welche einen tiefen Einblick in die Physiologie des menschlichen Organismus lieferten.

Prinzipiell ist auch ein NMR-Kontrast zur Darstellung des Faltungszustands von Proteinen möglich (Zaiss u. a., 2013). Ein solcher Kontrastmechanismus wäre von besonderem Interesse für die Diagnostik von diversen Pathologien, da die Denaturierung des Proteoms eines Organismus ein Anzeichen für übermäßige Belastungen, Erkrankung und Alterung ist. Eine Detektion der Signale von Proteinen ist mit Hilfe der MRS möglich. *In vitro* ermöglichen heutige spektroskopische NMR-Methoden darüber hinaus eine vollständige Aufschlüsselung der Molekülstruktur von Proteinen (Wuethrich, 1986). Die Detektion von Proteinen mittels der MRS *in vivo* ist allerdings aufgrund der geringen Konzentration an Proteinen durch eine unzureichende räumliche Auflösung und lange Messzeiten limitiert.

Die in dieser Arbeit verwendete NMR-Technik *Chemical Exchange Saturation Transfer* (CEST) (Wolff und Balaban, 1990; Ward u. a., 2000) stellt eine Möglichkeit dar, die spektrale Selektivität der MRS mit dem guten Signal-Rausch-Verhältnis der MRT zu kombinieren. Dabei wird der chemische Austausch (CA) zwischen Wasserprotonen und Protonen in organischen Verbindungen dazu verwendet, eine Signalverstärkung von niedrig konzentrierten Protonen zu erreichen. Dies wird durch eine selektive Sättigung chemisch austauschender Protonen in spezifischen funktionellen Gruppen und einer anschließenden MRT des modifizierten Wassersignals realisiert. Die spektroskopische Bildgebungstechnik CEST ermöglicht somit die indirekte Detektion niedrig konzentrierter Biomoleküle *in vivo* mit annähernd der Sensitivität der MRT. Durch eine sequentielle Sättigung bei unterschiedlichen Frequenzoffsets kann ein Sättigungsspektrum aufgenommen werden, welches Z-Spektrum genannt wird.

In den *in vivo* Z-Spektren sind CEST-Signale von verschiedenen Metaboliten und Proteinen aufgelöst. Aufgrund einer spektralen Überlappung können jedoch nur wenige Resonanzen zur selektiven Detektion von Proteinen verwendet werden. Dazu gehört das markante Signal der Amid-Protonen in den Peptidbindungen von Proteinen (Zhou u. a., 2003), welches bei einem Frequenzoffset von $\Delta\omega = 3,5$ ppm relativ zum Wassersignal ($\Delta\omega = 0$ ppm) resoniert. Vor kurzem wurden Signale von aliphatischen Protonen im Bereich negativer Frequenzoffsets ($\Delta\omega < 0$ ppm) mit Proteinen in Verbindung gebracht (Jin u. a., 2013; Jones u. a., 2013). Der Sättigungstransfer zwischen diesen nicht chemisch austauschenden, kovalent gebundenen Protonen und dem Wasser kann auf dipolare Wechselwirkungen zurückgeführt werden und wird als *exchange-relayed Nuclear Overhauser Effect* (rNOE) (Mori u. a., 1996b) bezeichnet.

In den letzten Jahren hat sich die CEST-Bildgebung zu einem viel zitierten Bereich der MRT entwickelt. Grund hierfür ist die Abhängigkeit der CEST-Signale von der effektiven Magnetisierungstransfer-Rate des zugrundeliegenden Austauschprozesses (CA oder rNOE), welche wiederum eine Funktion interessanter physikalischer und physiologischer Parameter ist. Somit eignet sich CEST nicht nur für die Detektion von Proteinen oder Metaboliten, sondern kann darüber hinaus Aufschluss über die Mikroumgebung in lebendem Gewebe geben. Die Abhängigkeit der Austauschrate im Fall eines CA vom pH-Wert ermöglicht daher z.B. eine pH-gewichtete NMR-Bildgebung *in vivo* (Zhou u. a., 2003; Sun u. a., 2008). Diese ist von besonderem Interesse für die Detektion und Klassifizierung von Schlaganfällen (Sun u. a., 2007b, 2011). Hingegen weisen rNOE-Signale eine starke Abhängigkeit von der Beweglichkeit der Moleküle auf, wodurch diese lediglich in Makromolekülen auftreten. Das Potential des rNOE zur Darstellung des Faltungszustands von Proteinen wurde *in vitro* zum ersten Mal im Jahre 2013 von (Zaiss u. a., 2013) am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg gezeigt. Dabei wurde eine Abnahme der rNOE-Signale aliphatischer Protonen unter Protein-Entfaltung beobachtet. Ein bekanntes Problem der CEST-Bildgebung ist allerdings die simultane Abhängigkeit der CEST-Signale von diversen Parametern. Somit können gleichermaßen abnehmende rNOE-Signale in nekrotischem Gewebe von Gehirntumoren (Jones u. a., 2013) nicht eindeutig mit einer Entfaltung von Proteinen in Verbindung gebracht werden.

Eine Analyse simultan variierender Parameter ist prinzipiell nur durch Aufnahme mehrerer Signale oder durch Detektion eines Signals bei unterschiedlichen Messeinstellungen möglich. Im Hinblick auf die Detektion einer Protein-Denaturierung *in vivo* ist daher das Ziel dieser Arbeit, die Untersuchung des Einflusses von Entfaltung und Aggregation auf die CEST-Signale von Proteinen. Durch die quantitative Bestimmung der zugrundeliegenden Austauschraten – unter Verwendung unterschiedlicher Sättigungs-Bedingungen – konnte darüber hinaus der Ursprung der beobachteten CEST-Signaländerungen unter Protein-Denaturierung untersucht werden.

Das zentrale Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist die Entdeckung charakteristischer Signaländerungen der rNOE- und CA-Signale von Proteinen unter Entfaltung und Aggregation (Goerke u. a., 2015a). Dabei wurde eine Abschwächung der rNOE-Signale unter Protein-Entfaltung und -Aggregation beobachtet. Für CA-Signale ist allerdings eine gegenläufige Änderung, mit einer Verstärkung unter Protein-Entfaltung und einer Abschwächung unter Protein-Aggregation, zu beobachten. Diese wurden in Signaturen der Protein-Entfaltung und -Aggregation zusammengefasst und ermöglichen prinzipiell eine Differenzierung dieser beiden Denaturierungs-Vorgänge.

In diesem Kontext wurde darüber hinaus zum ersten Mal die Existenz von rNOE-Signalen aromatischer Protonen im Bereich positiver Frequenzoffsets ($\Delta\omega > 0$ ppm) gezeigt. Die Berücksichtigung dieser Signale war aufgrund der spektralen Überlappung mit CA-Effekten essentiell für die korrekte Interpretation der beobachteten Signaländerungen. Des Weiteren konnten die gewonnenen Erkenntnisse dazu verwendet werden, einen NMR-Kontrast zu entwickeln, welcher sehr sensitiv auf Signaländerungen von Proteinen unter Denaturierung reagiert. Bei Berechnung dieses *Denatured Protein Contrast* (DPC) in CEST-Bilddaten von Gehirntumor-Patienten trat eine Signalerhöhung bemerkenswerterweise ausschließlich im Bereich der Tumoren auf. Inwiefern dieser Kontrast von anderen physiologischen Parametern abhängt ist Gegenstand der Diskussion.

Um diese Einblicke zu erlangen wurde die Präzision des CEST-Experimentes durch verschiedene Maßnahmen erhöht. Die Verwendung eines Ultrahochfeld-NMR-Spektrometers mit einer Magnetfeldstärke von $B_0 = 14,1$ T, sowie einer kleinen RF-Amplitude der Sättigungspulse $B_1 < 1 \mu\text{T}$ ermöglichte die Detektion von Z-Spektren mit hoher spektraler Auflösung. Des Weiteren war die Detektion isolierter CEST-Effekte, die frei sind von Relaxations-Effekten des Wassersignals, unter Verwendung der AREX-Auswertemethode von Z-Spektren (Zaiss u. a., 2014) möglich. Zusätzlich wurden zur Untersuchung der Protein-Entfaltung und -Aggregation einzelne Protein-Isoformen verwendet, welche kontrolliert denaturiert werden konnten. Um weitere Einblicke in das komplexe Zusammenspiel von Proteinen in einem lebenden Organismus zu erhalten, wurden Lysate von Zellen genutzt. Im Zusammenhang mit der Untersuchung dieser Modellsysteme wurden neue quantitative Methoden, wie die erweiterte Ω -Plot-Methode, die WEX-Spektroskopie und die zweidimensionale CEST-Spektroskopie (Goerke u. a., 2015b) validiert, deren Anwendung über diese Arbeit hinaus neue Einblicke in Magnetisierungstransfer-Prozesse liefern kann.

Durch Entdeckung der genannten Zusammenhänge wird die CEST-MRT auch interessant für Pathologien außerhalb der Krebsforschung; zu nennen wären hierbei z.B. Morbus Alzheimer, Chorea Huntington und andere neurodegenerative Erkrankungen, welche auf eine Degenerierung von Proteinen zurückgeführt werden.

2 Grundlagen

2.1 Grundlagen der NMR

Für eingehendere Recherchen der in diesem Abschnitt behandelten Themen wird zum Beispiel auf die beiden Büchern (Haacke u. a., 1999) und (Graaf, 2008) verwiesen.

2.1.1 Atomkerne im Magnetfeld

Atomkerne werden durch ihre charakteristische Zusammensetzung aus Protonen und Neutronen, welche als Fermionen einen halbzahligen Spin besitzen, kategorisiert. Es gilt die Regel, dass alle Atomkerne mit ungerader Anzahl an Protonen und/ oder Neutronen einen Kernspin \vec{I} ungleich Null haben. Umgangssprachlich ist mit der Bezeichnung Kernspin oft nur seine Quantenzahl $I = \frac{1}{2}, 1, \frac{3}{2}, \dots$ gemeint. Der Kernspin genügt der Drehimpulsalgebra mit den Eigenzuständen $|I, m\rangle$ der beiden kommutierenden Operatoren \hat{I}_z und \hat{I}^2 . Der Atomkern des Wasserstoffatoms ^1H , der lediglich ein Proton beinhaltet, hat einen Kernspin von $I = \frac{1}{2}$. Durch Anwendung dieser Operatoren auf die Eigenzustände, ergeben sich die zugehörigen Eigenwerte:

$$\hat{I}^2 |I, m\rangle = \hbar^2 I(I+1) |I, m\rangle \quad (2.1)$$

$$\hat{I}_z |I, m\rangle = \hbar m |I, m\rangle \quad (2.2)$$

mit der Magnetquantenzahl $m = -I, \dots, +I$, wobei $\Delta m = 1$ gilt. Das magnetische Moment $\vec{\mu}$ eines Kernspins \vec{I} ist definiert als:

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I} \quad (2.3)$$

mit dem kernspezifischen gyromagnetischen Verhältnis γ . Messungen ergeben für das Proton $\gamma = \frac{g_p \mu_N}{\hbar} = 2,675 \cdot 10^8 \frac{\text{Hz}}{\text{T}}$ bzw. $\frac{\gamma}{2\pi} = 42,58 \frac{\text{MHz}}{\text{T}}$. Die Wechselwirkung eines magnetischen Momentes $\vec{\mu}$ mit einem statischen externen Magnetfeld entlang der z-Koordinate $\vec{B} = (0, 0, B_0)$ wird durch nachfolgenden Hamiltonoperator beschrieben:

$$\hat{\mathcal{H}}_z = -\hat{\vec{\mu}} \vec{B} = -\hat{\mu}_z B_0 = -\gamma \hat{I}_z B_0 \quad (2.4)$$

Da $\hat{\mathcal{H}}_z$ linear in dem Spinoperator \hat{I}_z ist, besitzt dieser dieselben Eigenzustände. Für die Berechnung der Energieeigenwerte E_m kann somit für statische Magnetfelder die zeitunabhängige Schrödingergleichung $\hat{\mathcal{H}}_z |I, m\rangle = E_m |I, m\rangle$ verwendet werden:

$$E_m = \langle I, m | \hat{\mathcal{H}}_z | I, m \rangle = -\gamma B_0 \langle I, m | \hat{I}_z | I, m \rangle = -m \hbar \gamma B_0 \quad (2.5)$$

Die Aufspaltung in $(2I+1)$ Energiezustände wird Zeeman-Aufspaltung genannt. Somit ergibt sich im Fall eines Wasserstoffatoms eine Energiedifferenz der beiden möglichen Eigenzustände $|\frac{1}{2}, -\frac{1}{2}\rangle = |\alpha\rangle$ und $|\frac{1}{2}, +\frac{1}{2}\rangle = |\beta\rangle$ von (Abbildung 2.1):

$$\Delta E = E_{-\frac{1}{2}} - E_{\frac{1}{2}} = \hbar \gamma B_0 = \hbar \omega_R \quad (2.6)$$

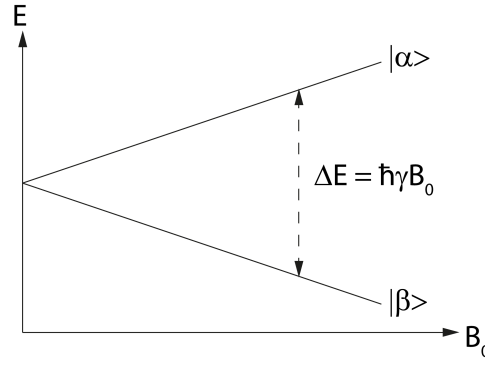


Abbildung 2.1: Beim Übergang vom energetisch günstigeren Eigenzustand $|\beta\rangle$ zu $|\alpha\rangle$ muss die Energiedifferenz ΔE aufgebracht werden bzw. wird in umgekehrter Richtung frei.

Die Resonanzfrequenz $\omega_R = \gamma B_0$ ist auch unter dem Synonym Larmorfrequenz bekannt. Für eine Magnetfeldstärke von $B_0 = 7\text{ T}$ bzw. $14,1\text{ T}$ ergibt sich somit eine ^1H -Resonanzfrequenz von $\nu_R = \frac{\omega_R}{2\pi} = 298\text{ MHz}$ und 600 MHz . Übergänge zwischen den Zeeman-Zuständen können durch zeitlich variierende Magnetfelder induziert werden.

2.1.2 Die makroskopische Magnetisierung

Man betrachte ein Ensemble von N Atomen mit Kernspin I in einem Wärmebad und externem Magnetfeld entlang der z -Koordinate $\vec{B} = (0, 0, B_0)$. Die Besetzungswahrscheinlichkeiten der $(2I + 1)$ Zustände des kanonischen Ensembles ergeben sich zu:

$$p_m = \frac{1}{Z} e^{-E_m/k_B T} \quad (2.7)$$

mit der Zustandssumme des kanonischen Ensembles $Z = \sum_{m=-I}^I e^{-E_m/k_B T}$ und der Boltzmann-Konstanten k_B . Verlässt man die allgemeine Darstellung und betrachtet ein Ensemble von N Wasserstoffatomen, so berechnet sich der Erwartungswert der z -Komponente des makroskopischen magnetischen Moments $\langle \hat{\mu}_z \rangle$ zu:

$$\begin{aligned} \langle \hat{\mu}_z \rangle &= \gamma \langle \hat{I}_z \rangle = \gamma \left[p_{-\frac{1}{2}} \langle \alpha | \hat{I}_z | \alpha \rangle + p_{+\frac{1}{2}} \langle \beta | \hat{I}_z | \beta \rangle \right] \\ &= \gamma \frac{\hbar}{2} [p_{+\frac{1}{2}} - p_{-\frac{1}{2}}] = \gamma \frac{\hbar}{2} P \end{aligned} \quad (2.8)$$

Die Polarisation P eines Ensembles ist definiert als die Besetzungsdifferenz der Energieniveaus, geteilt durch die Atomanzahl:

$$P = \frac{\Delta N}{N} = p_{+\frac{1}{2}} - p_{-\frac{1}{2}} \quad (2.9)$$

Unter Verwendung der Energieeigenwerte E_m aus Gleichung 2.5 berechnet sich die Polarisation zu:

$$P = \frac{e^{\frac{\gamma B_0 \hbar}{2k_B T}} - e^{-\frac{\gamma B_0 \hbar}{2k_B T}}}{e^{\frac{\gamma B_0 \hbar}{2k_B T}} + e^{-\frac{\gamma B_0 \hbar}{2k_B T}}} = \tanh\left(\frac{\gamma B_0 \hbar}{2k_B T}\right) \quad (2.10)$$

In der Hochtemperaturnäherung ($\gamma B_0 \hbar \ll k_B T$) kann der Tangens Hyperbolicus um die Stelle $x = 0$ Taylor-entwickelt werden ($\tanh x = x - \frac{1}{3}x^3 + \dots$), sodass sich in erster Ordnung folgende Näherung ergibt:

$$P \approx \frac{\gamma B_0 \hbar}{2k_B T} \quad (2.11)$$

Somit ergibt sich eine thermische Polarisierung von $P \approx 3,4 \cdot 10^{-6}$ bei einer Feldstärke von $B_0 = 1$ T und Raumtemperatur ($T = 298,15$ K). Die makroskopische Gleichgewichtsmagnetisierung \vec{M}_0 ist definiert als die Anzahl aller magnetischen Momente pro Volumen V mal dem mittleren magnetischen Moment:

$$\vec{M}_0 = \frac{N}{V} \langle \hat{\vec{\mu}} \rangle = \gamma \frac{\hbar N}{2V} \vec{P} \approx \frac{1}{4} \frac{N}{V} \frac{\gamma^2 \hbar^2}{k_B T} \vec{B} \quad (2.12)$$

mit der Einheit $\frac{J}{Tm^3}$. Die Temperaturabhängigkeit folgt dem Curie-Gesetz ($\propto \frac{1}{T}$) des Langevin-Paramagnetismus für freie magnetische Momente. Lediglich aufgrund der sehr hohen ^1H -Dichte $\frac{N}{V}$ (in reinem Wasser: $\frac{N}{V} = 2 \cdot 55 \text{ M} \approx 6,6 \cdot 10^{19} \frac{\text{Protonen}}{\text{mm}^3}$) genügt die geringe thermische Polarisierung in der Größenordnung von 10^{-6} , um eine messbare Signalintensität zu erzeugen.

2.1.3 Bloch-Gleichungen und Relaxation

Für Kernspins in einem zeitlich variierenden Magnetfeld gilt die zeitabhängige Schrödinger-Gleichung:

$$i\hbar \frac{\partial}{\partial t} |I, m\rangle = \hat{\mathcal{H}}(t) |I, m\rangle \quad (2.13)$$

mit dem zeitabhängigen Hamiltonoperator $\hat{\mathcal{H}}(t) = -\hat{\vec{\mu}} \cdot \vec{B}(t)$. Aufgrund der großen Anzahl an Wasserstoffatomen im Messvolumen, kann lediglich die Zeitabhängigkeit des Erwartungswerts des quantenmechanischen Operators $\hat{\vec{\mu}}$ untersucht werden. Mit Hilfe des Ehrenfest-Theorems:

$$\frac{d}{dt} \langle \hat{\mu}_j \rangle = \frac{i}{\hbar} \langle [\hat{\mathcal{H}}, \hat{\mu}_j] \rangle + \left\langle \frac{\partial \hat{\mu}_j}{\partial t} \right\rangle \quad (2.14)$$

wobei $j = x, y, z$, und der Drehimpulsalgebra:

$$[\mathbf{I}_i, \mathbf{I}_j] = i\hbar \epsilon_{ijk} \mathbf{I}_k \quad (2.15)$$

wobei $i, j, k \in [x, y, z]$, ergibt sich die zeitliche Variation des mittleren magnetischen Momentes zu:

$$\frac{d}{dt} \langle \hat{\vec{\mu}} \rangle = \langle \hat{\vec{\mu}} \rangle \times \gamma \vec{B}(t) \quad (2.16)$$

Nach dem Korrespondenzprinzip handelt es sich hierbei um das Verhalten klassischer magnetischer Momente in einem zeitlich variierenden Magnetfeld $\vec{B}(t)$, weshalb im folgenden das quantenmechanische Konzept aufgegeben wird und lediglich die Phänomenologie der makroskopischen Magnetisierung $\vec{M} = \frac{N}{V} \langle \vec{\mu} \rangle$ analysiert wird.

2 Grundlagen

Angenommen wird ein statisches Magnetfeld \vec{B}_0 in z-Richtung sowie ein zeitabhängiges Radiofrequenz-Feld (RF) $\vec{B}_1(t)$, das in der x-y-Ebene mit der Frequenz ω_{RF} oszilliert:

$$\vec{B}(t) = \vec{B}_0 + \vec{B}_1(t) = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ B_0 \end{pmatrix} + B_1 \begin{pmatrix} \cos(\omega_{RF}t) \\ \sin(\omega_{RF}t) \\ 0 \end{pmatrix} \quad (2.17)$$

Die Dynamik der Magnetisierung \vec{M} im Laborsystem S ergibt sich durch Einsetzen des zeitabhängigen Magnetfeldes $\vec{B}(t)$ in Gleichung 2.16. Durch eine Koordinatentransformation in ein mit der Frequenz $\vec{\omega}_{RF} = -\omega_{RF} \cdot \vec{e}_z$ rotierendes System S' ($(\frac{d\vec{v}}{dt})_{S'} = (\frac{d\vec{v}}{dt})_S + \vec{v} \times \vec{\omega}_{RF}$) vereinfacht sich die Darstellung zu:

$$\frac{d\vec{M}'}{dt} = \vec{M}' \times \gamma \vec{B}_{eff} \quad (2.18)$$

mit dem effektiven magnetischen Feld \vec{B}_{eff} :

$$\vec{B}_{eff} = (B_0 - \frac{\omega_{RF}}{\gamma}) \cdot \vec{e}_z + B_1 \cdot \vec{e}_{x'} \quad (2.19)$$

Im Fall, dass das eingestrahlte RF-Feld mit der ^1H -Resonanzfrequenz oszilliert $\omega_{RF} = \omega_R = \gamma B_0$, wirkt im mitrotierenden System S' lediglich ein statisches Feld B_1 in x'-Richtung (Abbildung 2.2). Somit präzediert \vec{M}' in der y'-z-Ebene mit der Frequenz $\omega_1 = \gamma B_1$ um die x'-Achse. Nach Beendigung der RF-Einstrahlung präzedieren die transversalen Komponenten der Magnetisierung \vec{M} um das statische Grundmagnetfeld \vec{B}_0 .

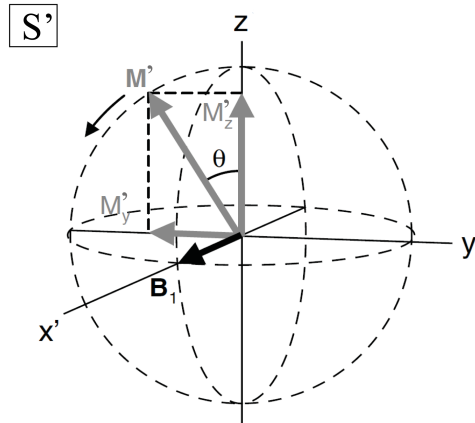


Abbildung 2.2: Dynamik des Magnetisierungsvektors \vec{M}' im rotierenden Koordinatensystem S' bei on-resonanter RF-Einstrahlung $\omega_{RF} = \omega_R = \gamma B_0$. Die Abbildung wurde aus (Graaf, 2008) übernommen.

In einem realen NMR-Experiment relaxiert nach einer gewissen Zeit eine zum statischen Magnetfeld \vec{B}_0 verkippte Magnetisierung \vec{M} zurück ins thermische Gleichgewicht. Experimentelle Ergebnisse zeigen, dass die zu \vec{B}_0 parallele Komponente M_z mit einer Geschwindigkeit proportional zur Differenz von M_z und der Gleichgewichtsmagnetisierung ins thermische Gleichgewicht zurückkehrt. Die transversalen Komponenten M_x und M_y zerfallen proportional zu ihrer

momentanen Größe. Die von Felix Bloch durch die kinetischen Termen dieser beiden Relaxationsprozesse erweiterte Gleichung 2.16, stellt die fundamentalen Gleichungen der Magnetresonanz dar, die Bloch-Gleichungen:

$$\frac{dM_x}{dt} = \gamma(\vec{M} \times \vec{B})_x - \frac{M_x}{T_2} \quad (2.20)$$

$$\frac{dM_y}{dt} = \gamma(\vec{M} \times \vec{B})_y - \frac{M_y}{T_2} \quad (2.21)$$

$$\frac{dM_z}{dt} = \gamma(\vec{M} \times \vec{B})_z - \frac{M_z - M_0}{T_1} \quad (2.22)$$

mit der Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 und der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 . Der transversalen bzw. T_2 -Relaxation liegt eine Dephasierung der einzelnen Spinpakete untereinander zugrunde. Hierbei wird keinerlei Energie an die Umgebung abgegeben, sondern lediglich zwischen den einzelnen Spins ausgetauscht. Die longitudinale bzw. T_1 -Relaxation hingegen resultiert aus einem Energietransfer zwischen den Spin-Energieniveaus und dem thermischen Reservoir ("Gitter") und wird durch Bewegungen von Molekülen, die in zeitlich variierende Magnetfelder resultieren, induziert.

2.1.4 Magnetresonanz-Signal

Mit Hilfe der Bloch-Gleichungen (2.20 bis 2.22) lässt sich die zeitliche Entwicklung der transversalen ($M_t(t) = M_x(t) + iM_y(t)$) und longitudinalen Komponente der Magnetisierung \vec{M} in Bezug auf ein statisches Magnetfeld \vec{B}_0 in z-Richtung berechnen:

$$M_t(t) = M_t(0)e^{i\omega_R t} e^{-t/T_2} \quad (2.23)$$

$$M_z(t) = M_0 - (M_0 - M_z(0))e^{-t/T_1} \quad (2.24)$$

mit $M_t(0)$ und $M_z(0)$ zum Zeitpunkt des Beginns der T_1 - bzw. T_2 -Relaxation.

Das Magnetresonanz (MR)-Signal ist eine induzierte Spannung in einer Empfängerspule, die sensitiv auf eine zeitliche Variation der transversalen Komponente der Magnetisierung $M_t(t)$ reagiert. Folglich wird das MR-Signal durch die Zeitkonstante T_2 gedämpft, was als freier Induktionszerfall (FID) bezeichnet wird (Abbildung 2.3). Im realen NMR-Experiment beobachtet man jedoch eine gegenüber T_2 verkürzte T_2^* -Relaxation ($T_2^* < T_2$), da aufgrund von Feldinhomogenitäten ΔB die einzelnen Spinpakete untereinander schneller dephasiert werden. Die Fourier-Transformierte (FT) des exponentiellen Abfalls als Funktion der Zeit t ist eine lorentzförmige Resonanz im Frequenzspektrum. Die Halbwertsbreite der Resonanz beträgt $\text{FWHM} = 2/T_2^*$. Trotz konstanter Magnetfeldstärke \vec{B}_0 können in einem NMR-Spektrum jedoch Resonanzen mit unterschiedlichen Larmorfrequenzen ω_R auftreten.

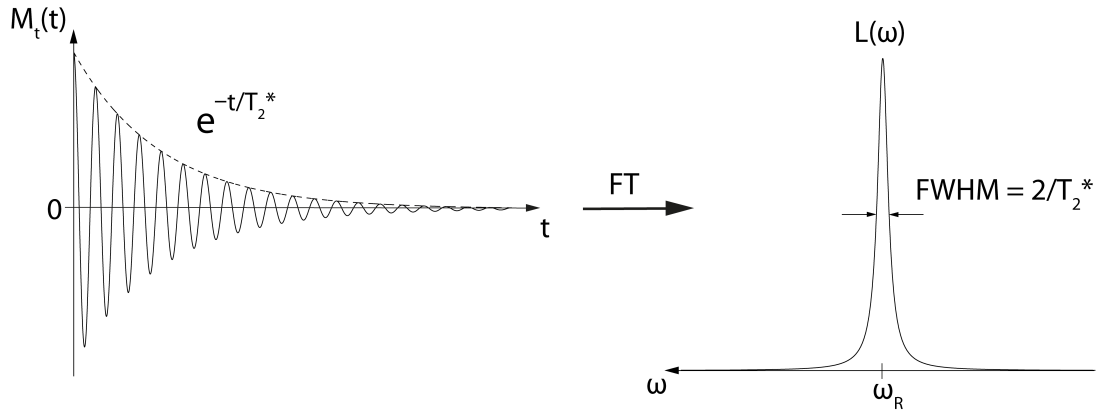


Abbildung 2.3: Die Fourier-Transformierte des FID (links) ist eine lorentzförmige Resonanz an der Stelle ω_R im Frequenzspektrum (rechts).

2.1.5 Chemische Verschiebung

Betrachtet man in Moleküle gebundene Atomkerne, so bewirkt die ortsabhängige diamagnetische Abschirmung der Elektronenhülle eine Änderung des mit dem Kernspin wechselwirkenden lokalen Magnetfelds $\vec{B}_{lok} = \vec{B}_0 + \delta\vec{B} = \vec{B}_0(1 - \vec{\sigma})$, mit dem Abschirmungstensor $\vec{\sigma}$. Die resultierende Resonanzfrequenzverschiebung eines Kernspins hängt stark von der chemischen Umgebung des Atomkerns und somit von der Struktur des Moleküls ab. Die chemische Verschiebung δ_i einer chemischen Umgebung i ist definiert als ein B_0 -unabhängiges Frequenzverhältnis mit Bezug auf eine Referenzfrequenz ω_{ref} :

$$\delta_i = \frac{\omega_i - \omega_{ref}}{\omega_{ref}} \quad (2.25)$$

δ_i liegt typischerweise in der Größenordnung von ppm (parts per million, 10^{-6}). Da konventionsgemäß größer werdende Werte der chemischen Verschiebung im NMR-Spektrum nach links aufgetragen werden, folgt dass auch die Larmorfrequenz im NMR-Spektrum von rechts nach links ansteigt und die Abschirmung in gleicher Richtung immer schwächer wird (Abbildung 2.3).

Die Referenzfrequenz ω_{ref} ist die Larmorfrequenz einer geeigneten Referenzsubstanz. Für ^1H -NMR wird hierfür üblicherweise die Resonanz der Protonen in Tetramethylsilan (TMS, $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$, $\delta_{\text{TMS}} = 0$) verwendet, da diese eine sehr starke Abschirmung des äußeren Magnetfelds erfahren und somit separiert von anderen endogenen Signalen im NMR-Spektrum resonieren. Aufgrund der zentralen Rolle des Wassersignals in der CEST-NMR, wird dieses auch bei der Darstellung des CEST-Frequenzspektrums als Referenz verwendet ($\delta_w = 0$). Die Resonanzfrequenzverschiebung $\delta\omega_i$ einer chemischen Umgebung i in Bezug auf das Wassersignal ist somit:

$$\delta\omega_i = \omega_i - \omega_w = \delta_i\omega_w \quad (2.26)$$

2.2 Grundlagen des Magnetisierungstransfers

Betrachtet man verschiedene miteinander im Austausch stehende Kompartimente so kann ein Übertrag von Magnetisierung zwischen den Kompartimenten beobachtet werden. In diesem Kontext wird ein Pool i von Protonen über die Eigenschaft gleicher chemischer Verschiebung δ_i , identischer Austauschraten k_{ij} mit anderen Pools j , sowie einheitlicher Relaxationszeiten (T_{1i} , T_{2i}) definiert. In wässrigen Medien kann der Magnetisierungstransfer zwischen verschiedenen Pools prinzipiell auf drei verschiedene Mechanismen zurückgeführt werden:

- **Chemischer Austausch:**
Durch chemische Reaktionen können Protonen eines bestimmten Pools abgespalten und an einen anderen Pool gebunden werden. Da der quantenmechanische Zustand des Kernspins bei diesem physischen Übertrag von Protonen unverändert bleibt, führt dies zu einem Magnetisierungstransfer.
- **Dipolare Wechselwirkungen:**
Durch dipolare Wechselwirkungen von Kernspins ergeben sich gekoppelte Spinsysteme. Dabei werden neue Kreuzrelaxationspfade zwischen verschiedenen Pools ermöglicht, durch die Magnetisierung ausgetauscht werden kann.
- **Molekularer Austausch:**
Je nach makromolekularer Umgebung können Moleküle einen freien oder gebundenen Bewegungszustand einnehmen. Durch Diffusion kommt es zu einem Austausch zwischen den beiden Zuständen, wobei die chemischen Verschiebungen und Relaxationsraten der in den Molekülen gebundenen Protonen variieren.

Im Hinblick auf CEST-Spektroskopie werden im Folgenden die dominanten Magnetisierungstransfer-Pfade zwischen Wasserprotonen und Protonen gelöster organischer Verbindungen genauer erläutert.

2.2.1 Chemischer Austausch (CA)

Der physische Austausch von Wasserprotonen und Protonen bestimmter funktioneller Gruppen in Proteinen, Peptiden, Metaboliten, etc. wird durch chemische Säure-Base-Reaktionen initiiert. Der dadurch hervorgerufene Magnetisierungstransfer von einem Pool s austauschender Protonen zum Wasser-Pool w wird mittels der Austauschrate k_{sw} charakterisiert (Zhou und van Zijl, 2006; Liepinsh und Otting, 1996):

$$k_{sw} = k_{\text{Base}} \cdot [\text{OH}^-] + k_{\text{Säure}} \cdot [\text{H}_3\text{O}^+] + k_{\text{Puffer}} \quad (2.27)$$

mit der Konzentration an Hydroxyl-Ionen $[\text{OH}^-]$ und Oxonium-Ionen $[\text{H}_3\text{O}^+]$. Die Proportionalitätskonstanten k_{Base} und $k_{\text{Säure}}$ in $\frac{1}{\text{mol s}}$ sind die Geschwindigkeitskonstanten der base- bzw. säurekatalysierten chemischen Reaktion. Diese beinhalten die Temperaturabhängigkeit des Austauschprozesses, die durch die Arrhenius-Gleichung gegeben ist (Atkins und Paula, 2006). Zusätzlich können Säure-Base-Reaktionen durch Puffersysteme, wie zum Beispiel Phosphate (H_3PO_4) oder Karbonate (H_2CO_3) katalysiert werden. Die genaue Aufschlüsselung dieser Katalysemechanismen in Reaktionsgeschwindigkeiten und Reaktionspartner hängt sehr stark von der jeweiligen funktionellen Gruppe ab, weshalb hier lediglich die Rate k_{Puffer} aufgeführt ist, die die Allgemeinheit aller Katalyseprozesse eines chemischen Austauschs repräsentiert.

Unter Verwendung der Definition des pH- und pOH-Wertes, sowie des logarithmischen Ionenprodukts des Wassers $pK_w(T) = pH + pOH$ (Atkins und Paula, 2006) lässt sich die Austauschrate in allgemeiner Form (Gleichung 2.27) als Funktion des pH und der Temperatur darstellen:

$$k_{sw}(pH, T) = k_{Base}(T) \cdot 10^{pH - pK_w(T)} + k_{Säure}(T) \cdot 10^{-pH} + k_{Puffer}(pH, T) \quad (2.28)$$

Folglich werden säurekatalysierte Austauschprozesse mit steigendem pH unterdrückt, wohingegen basekatalysierte Reaktionen beschleunigt werden (Abbildung 2.4). Je nach Art der funktionellen Gruppe ist der base- bzw. säurekatalysierte Protonentransfer mehr oder weniger dominant, wodurch die Austauschrate k_{sw} über mehrere Größenordnungen variiert.

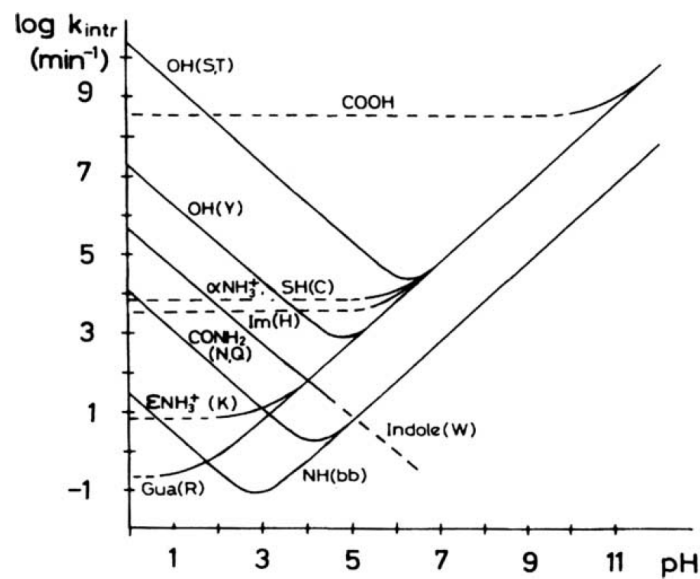


Abbildung 2.4: Logarithmische Darstellung der Austauschrate k_{sw} verschiedener funktioneller Gruppen (OH, COOH, NH, NH_3^+ , $CONH_2$, SH, Im = Imidazol-Ring NH, Indole = Indol-Ring NH, Gua = Guanidinium $(NH_2)_2^+$) in Aminosäuren als Funktion des pH bei $T = 25^\circ C$. Die jeweiligen Aminosäuren sind durch den Ein-Buchstaben-Code (siehe Abbildung 2.14) in Klammern gekennzeichnet. bb bezeichnet das Rückgrat (engl. *backbone*, bb) der Aminosäurekette. Zu beachten ist die abweichende Einheit der Austauschrate in min^{-1} im Vergleich zur üblich verwendeten Notation in dieser Arbeit $Hz = s^{-1}$. Die Abbildung wurde aus (Wuethrich, 1986) übernommen.

Die explizite Ausführung der Temperaturabhängigkeit der Austauschrate (Gleichung 2.28) ist in (Goerke, 2012) beschreiben. Generell kann jedoch von einer exponentiellen Abhängigkeit der Austauschrate als Funktion der Temperatur, die durch die Aktivierungsenergie der chemischen Reaktion bestimmt ist, ausgegangen werden.

2.2.2 Dipolare Wechselwirkungen

In diesem Unterabschnitt wird der Magnetisierungstransfer zwischen verschiedenen Pools, der durch dipolare Wechselwirkungen der Kernspins vermittelt wird, erläutert. Dieser Mechanismus wurde unter dem Namen Kern-Overhauser-Effekt (engl. *Nuclear Overhauser Effect*, NOE) bekannt. Konventionelle NOE-Experimente nutzen den Magnetisierungstransfer zwischen zwei Pools verschiedener Atomsorten (heteronuklearer NOE: $^1\text{H}-^{31}\text{P}$, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$, etc.), um eine MR-Signalverstärkung zu induzieren. In der CEST-Spektroskopie, die den Magnetisierungstransfer zwischen Pools von Protonen detektiert, ist hingegen der sogenannte homonukleare NOE zwischen Pools der selben Atomspezies von Bedeutung. Somit beschränken sich nachfolgende Ausführungen des NOE lediglich auf den Fall dipolar gekoppelter Protonen ($^1\text{H}-^1\text{H}$). Für tiefer gehende Literatur der behandelten Themen wird auf (Neuhaus und Williamson, 1989), (Solomon, 1955) und (Goerke, 2012) verwiesen.

Homonukleares dipolar gekoppeltes 2-Pool-System

Zwei dipolar wechselwirkende Kernspins mit $I = \frac{1}{2}$ koppeln zu einem Gesamtspin $S = 0$ oder 1 , welcher wiederum an ein externes Magnetfeld koppeln kann. Somit ergeben sich insgesamt vier mögliche Spin-Zustände $|S, m\rangle$ ($m = -S, \dots, +S$) des gekoppelten 2-Spin-Systems. Berechnet man die Energieeigenwerte dieser Zustände, so beobachtet man eine Energieverschiebung $\Delta E_{S,m}$ im Vergleich zur Zeeman-Aufspaltung zweier entkoppelter Kernspins (Abbildung 2.1). Diese Energieverschiebung wird durch den Dipol-Dipol-Hamiltonoperator \mathcal{H}_{DD} hervorgerufen und ist in der Größenordnung der dipolaren Kopplungskonstante (Goerke, 2012) :

$$\omega_{DD} = \frac{\mu_0 \hbar \gamma^2}{4\pi r^3} \quad (2.29)$$

mit der magnetischen Feldkonstante μ_0 und dem Wechselwirkungsabstand der beiden Kernspins r . Vergleicht man die Energieverschiebung mit der Energieaufspaltung des Zeeman Hamiltonoperators:

$$\frac{\Delta E_{DD}(r = 0,3 \text{ nm})}{\Delta E_z(B_0 = 1 \text{ T})} \approx 10^{-4} \ll 1 \quad (2.30)$$

so wird deutlich, dass diese vernachlässigt werden kann. Somit kann auch im Fall einer dipolaren Wechselwirkung der Kernspins untereinander, die einen starken Einfluss auf das Relaxationsverhalten der Kernspins ausübt, eine separate Kopplung der einzelnen Kernspins an das externe Magnetfeld angenommen werden (Abbildung 2.5).

Betrachtet man zwei Pools von Protonen w und s , die durch eine dipolare Wechselwirkung miteinander gekoppelt sind, so relaxiert deren Magnetisierung über die in Abbildung 2.5 skizzierten Pfade. Mittels der Kreuzrelaxationspfade mit den Übergangswahrscheinlichkeiten W_{0ws} (sog. Flip-Flop-Übergang) und W_{2ws} (sog. Flip-Flip- bzw. Flop-Flop-Übergang) kann folglich Magnetisierung zwischen den beiden Pools hin und her gepumpt werden. Die zeitliche Entwicklung der Magnetisierung ist durch die Solomon-Gleichungen gegeben (Solomon, 1955). In diesem Kontext wird die Kreuzrelaxationsrate σ definiert, die in Analogie zu einem chemischen Austausch den Magnetisierungstransfer zwischen den beiden Pools charakterisiert ($\sigma \triangleq -k_{sw}$):

$$\sigma = W_{2ws} - W_{0ws} \quad (2.31)$$

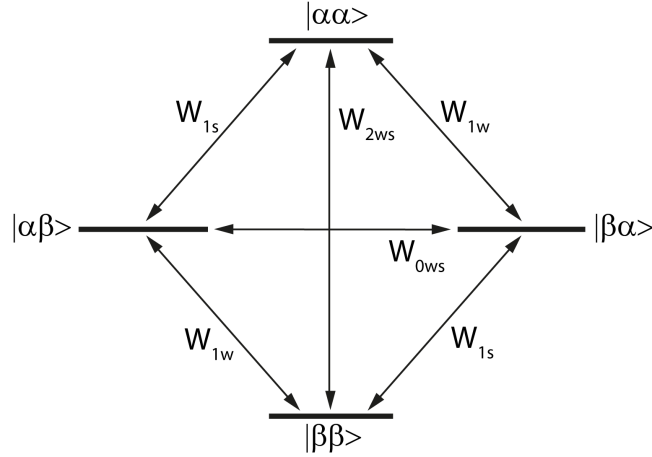


Abbildung 2.5: Energieniveaus eines dipolar gekoppelten 2-Spin-Systems im externen Magnetfeld, mit den Spin-Zuständen $|ws\rangle$ ($w, s = \alpha, \beta$) und den Übergangswahrscheinlichkeiten W_{ij} ($i = 0, 1, 2$ und $j = w, s, ws$).

Übergänge zwischen den Energieniveaus werden durch zeitlich variierende Magnetfelder induziert, weshalb die Übergangswahrscheinlichkeiten eine Funktion der mittleren molekularen Bewegung der betrachteten Protonen relativ zum externen Magnetfeld sind. Mittels der allgemeingültigen Definition der Übergangswahrscheinlichkeiten, Fermis Goldene Regel, berechnen sich die Übergangsraten der Kreuzrelaxationspfade zu:

$$W_{2ws} = \frac{3}{5} \omega_{DD}^2 \frac{\tau_c}{1 + (\omega_w + \omega_s)^2 \tau_c^2} \quad (2.32)$$

$$W_{0ws} = \frac{1}{10} \omega_{DD}^2 \frac{\tau_c}{1 + (\omega_w - \omega_s)^2 \tau_c^2} \quad (2.33)$$

mit der Korrelationszeit τ_c , welche der Zeit entspricht, die ein Molekül oder eine bewegliche Gruppe eines Moleküls benötigt, sich um $2\pi = 360^\circ$ um eine beliebige Achse zu drehen. Für die Resonanzfrequenzen der beiden Pools ω_w und ω_s gilt im Fall eines homonuklearen Systems in einem externen Magnetfeld hoher Feldstärke im Bereich von einigen T: $\omega_w \approx \omega_s \approx \omega_R = \gamma B_0$. Somit ergibt sich für die Abhängigkeit der Kreuzrelaxationsrate von den molekularen Bewegungen, sowie des Wechselwirkungsabstandes der Kernspins aus den beiden Pools r :

$$\sigma(\tau_c, r) = \frac{\mu_0^2 \hbar^2 \gamma^4}{160 \pi^2} \left[\frac{6}{1 + 4 \omega_R^2 \tau_c^2} - 1 \right] \frac{\tau_c}{r^6} \quad (2.34)$$

Diese Funktion weist eine Nullstelle bei $\omega_R \tau_c = 1, 12$ auf, was einer Korrelationszeit $\tau_c = 4,2 \text{ ns}$ bei einer Feldstärke von $B_0 = 1 \text{ T}$ entspricht. Mit Hilfe dieser Nullstelle kann die Korrelationszeit in zwei Abschnitte unterteilt werden:

- $\omega_R \tau_c \ll 1, 12$ ($\sigma > 0$):
Dies ist der Bereich schneller molekularer Bewegungen, die in wässrigen Lösungen bei kleinen Molekülen (Wasser, Metabolite, etc.) auftreten. Im Englischen wird dieser Abschnitt als *extreme narrowing limit* bezeichnet.

- $\omega_R \tau_c \gg 1, 12$ ($\sigma < 0$):

Hierbei handelt es sich um den Bereich langsamer molekularer Bewegungen, wie sie in wässrigen Lösungen bei Makromolekülen (Peptide, Proteine, etc.) zu finden sind. Dieser Abschnitt wird im Englischen *spin diffusion limit* genannt.

Für mobile Makromoleküle, wie z.B. Proteine mit einer molaren Masse im Bereich von mehreren kDa = 10^3 g/mol, liegt die Korrelationszeit in der Größenordnung von μ s. In diesem Bereich dominiert der Energie erhaltende Flip-Flop-Übergang den Magnetisierungstransfer des dipolar gekoppelten 2-Pool-Systems. Folglich ist $\sigma \approx -W_{0ws}$ eine B_0 unabhängige lineare Funktion der Korrelationszeit und kann Werte in der Größenordnung von einigen Hz annehmen (Abbildung 2.6).

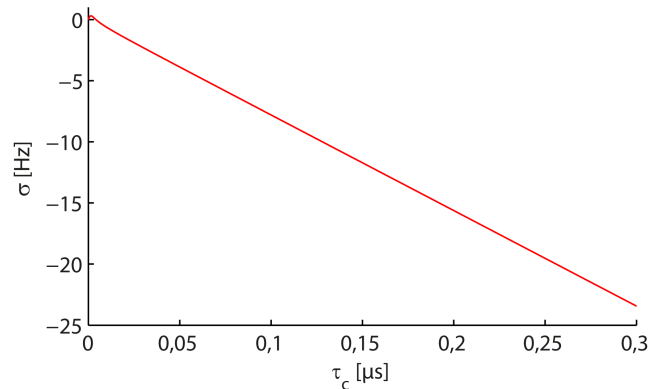


Abbildung 2.6: Für Korrelationszeiten τ_c in der Größenordnung von μ s nimmt die Kreuzrelaxationsrate σ Werte an, die im Bereich von einigen Hz liegen und unabhängig von der Magnetfeldstärke B_0 sind. Für die Berechnung wurde ein Wechselwirkungsabstand $r = 0,3$ nm, der dem Durchmesser von drei Wasserstoffatomen entspricht, angenommen.

Da die Methode CEST lediglich sensitiv auf Austauschmechanismen mit Transferraten > 1 Hz ist, können folglich mittels CEST nur dipolare Magnetisierungstransfer-Prozesse von Protonen, welche in Makromolekülen gebundenen sind detektiert werden.

Spin-Diffusion

Da organische Makromoleküle eine hohe Protonendichte aufweisen, ist ein Pool von Protonen meist nicht nur mit einem, sondern mit diversen anderen Pools durch intra-molekulare dipolare Wechselwirkungen gekoppelt. Dadurch kann Magnetisierung, über mehrere Pools hinweg, über weite Distanzen innerhalb des Moleküls transferiert werden. Dieser Magnetisierungstransfer beruht auf einem kontinuierlichen Austausch an Energie zwischen den einzelnen Pools, der durch Energie erhaltende Flip-Flop-Übergänge vermittelt wird (in Makromolekülen: $\sigma \approx -W_{0ws}$, siehe Paragraph zuvor). Polarisationsunterschiede innerhalb von Makromolekülen können daher im Vergleich zu anderen Relaxationsmechanismen auf einer viel kürzeren Zeitskala ausgeglichen werden ($\sigma \approx 1 - 20$ Hz). Aufgrund der starken Abhängigkeit der Kreuzrelaxationsrate vom Wechselwirkungsabstand der Kernspins $\sigma \sim 1/r^6$ (Gleichung 2.34), ist der Magnetisierungstransfer durch Spin-Diffusion meist auf einzelne Domänen der Makromoleküle beschränkt. Ist

hingegen ein anderes Molekül vorübergehend starr an eine bestimmte Domäne des Makromoleküls gebunden, so sind je nach molarer Masse der Moleküle inter-molekulare Spin-Diffusions-Prozesse nicht auszuschließen.

2.2.3 Exchange-relayed NOE (rNOE)

In diesem Unterabschnitt wird der dominante Magnetisierungstransferpfad zwischen Wasserprotonen und nicht austauschenden kovalent gebundenen Protonen in mobilen Makromolekülen beschrieben. Da freie Wassermoleküle sehr kurze Korrelationszeiten besitzen, ist der Magnetisierungstransfer durch inter-molekulare dipolare Wechselwirkungen zu anderen Molekülen sehr langsam. Effizienter und gleichzeitig der dominanteste Magnetisierungstransfer-Pfad ist daher eine Kombination aus den beiden zuvor beschriebenen Magnetisierungstransfer-Mechanismen (van Zijl und Yadav, 2011; van Zijl u. a., 2003; Xu u. a., 2014a) :

- (i) Intra-molekulare Spin-Diffusion-Prozesse der Kernspins innerhalb der Makromoleküle (Unterabschnitt 2.2.2)
- (ii) Inter-molekulare chemische Austauschprozesse zwischen in Wasser und Makromolekülen gebundenen Protonen (Unterabschnitt 2.2.1)

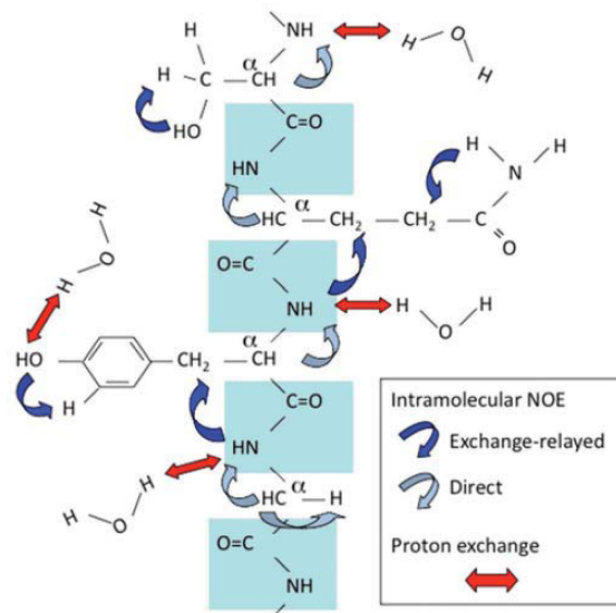


Abbildung 2.7: Magnetisierung wird durch intra-molekulare Spin-Diffusion-Prozesse (blaue und graue Pfeile) von fest gebundenen Protonen ($-\text{CH}_2-$, etc.) zu austauschenden chemischen Gruppen ($-\text{NH}-$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, etc.) innerhalb eines Makromoleküls (z.B. Proteine) transferiert. Der chemische Austausch von Protonen (rote Pfeile) mit umliegenden Wassermolekülen ermöglicht den Weitertransport der Magnetisierung zum Wasser. Dieser Magnetisierungstransfer-Pfad zwischen Wasserprotonen und nicht austauschenden kovalent gebundenen Protonen in Makromolekülen wird im Englischen *exchange-relayed NOE* (rNOE) genannt. Die Abbildung wurde aus (van Zijl und Yadav, 2011) übernommen.

Im Englischen wird dieser Magnetisierungstransfer-Pfad als *exchange-relayed NOE* (rNOE) bezeichnet (Abbildung 2.7). Da der rNOE-Magnetisierungstransfer zum Wasser-Pool durch die verhältnismäßig langsamen intra-molekularen Spin-Diffusion-Prozesse limitiert wird, weist dieser in mobilen Makromolekülen effektive Magnetisierungstransfer-Raten im Bereich von 2 – 5 Hz (Friedman u. a., 2015) auf. Änderungen der chemischen Austauschprozesse, hervorgerufen durch z.B. pH-Variationen, beeinflussen die effektive Magnetisierungstransfer-Rate des rNOE hingegen nur geringfügig (Jin u. a., 2013; Jones u. a., 2013).

2.2.4 Semi-solid Magnetization Transfer (ssMT)

Im Folgenden wird der Magnetisierungstransfer zwischen Wasserprotonen und der makromolekularen Matrix (rigide halb feste Bestandteile einer Zelle, wie z.B. Zellmembranen, Oberflächenproteine, Cytoskelett, etc.) behandelt (engl. *semi-solid Magnetization Transfer*, ssMT). Aufgrund der Festkörper ähnlichen Beschaffenheit der makromolekularen Matrix, liegen die T_2 -Relaxationszeiten von Protonen in der Größenordnung von μ s. Resonanzen im NMR-Spektrum weisen daher eine Halbwertsbreite im Bereich von kHz auf, was eine direkte Detektion schwierig gestaltet. Die indirekte Messung der makromolekularen Matrix über das Wassersignal kann jedoch als Bildkontrast (engl. *Magnetization Transfer Contrast*, MTC) in der MRT genutzt werden (Henkelman u. a., 2001). Der ssMT beruht auf folgenden Magnetisierungstransfer-Mechanismen (van Zijl und Yadav, 2011):

- (i) Intra-molekulare Spin-Diffusion-Prozesse der Kernspins innerhalb der makromolekularen Matrix (Unterabschnitt 2.2.2)
- (ii) Inter-molekulare dipolare Wechselwirkungen (Unterabschnitt 2.2.2) und inter-molekulare chemische Austauschprozesse (Unterabschnitt 2.2.1) zwischen Wasserprotonen und Protonen in der makromolekularen Matrix
- (iii) Molekularer Austausch von Wassermolekülen in einem freien und gebundenen Bewegungszustand

Betrachtet man Wassermoleküle in der Umgebung einer makromolekularen Matrix, so können diese einen freien oder gebundenen Zustand einnehmen (molekularer Austausch). Der gebundene Zustand ist dabei durch eine stark eingeschränkte Mobilität und somit verlängerte Korrelationszeit der Wassermoleküle charakterisiert. Dies ermöglicht inter-molekulare dipolare Wechselwirkungen zwischen Wasserprotonen und Protonen an der Oberfläche der makromolekularen Matrix, die im Fall von mobilen Makromolekülen vernachlässigt werden können (Abbildung 2.8). Der kontinuierliche molekulare Austausch zwischen dem freien und gebundenen Bewegungszustand des Wassers, der durch Diffusion hervorgerufen wird, ermöglicht im letzten Schritt den Magnetisierungstransfer zum freien Wasser. Magnetisierung kann daher innerhalb der makromolekularen Matrix über intra-molekulare Spin-Diffusion-Prozesse verteilt werden und über inter-molekulare NOE, sowie über chemische Austauschprozesse auf das Wasser übertragen werden. Die effektive Magnetisierungstransfer-Rate des ssMT liegt im Bereich von 40 Hz (Stanisz u. a., 2005).

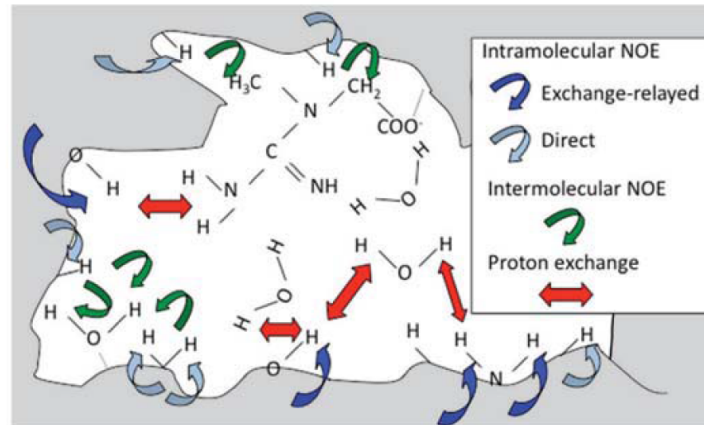


Abbildung 2.8: Magnetisierung kann innerhalb der makromolekularen Matrix (grauer Hintergrund) über intra-molekulare Spin-Diffusion-Prozesse (blaue und graue Pfeile) verteilt werden. Über inter-molekulare dipolare Wechselwirkungen (grüne Pfeile), sowie über chemische Austauschprozesse (rote Pfeile) wird die Magnetisierung auf Wassermoleküle, die sich in einem an die makromolekulare Matrix gebunden Zustand befinden, übertragen. Die Abbildung wurde aus (van Zijl und Yadav, 2011) übernommen.

2.3 Das Phänomen CEST

Chemical Exchange Saturation Transfer (CEST) ermöglicht die indirekte Detektion niedrig konzentrierter organischer Verbindungen im mM-Bereich mittels des Magnetisierungstrfers zum Wasser. Dabei wird die ^1H -Signalverstärkung (engl. *proton transfer enhancement*, PTE) des raren Pools durch den großen Wasser-Pool ($c_w \approx 55,5\text{M}$) ausgenützt. Diese ist proportional zur T_1 -Relaxationszeit des Wassers und der Austauschrate k_{sw} des zugrundeliegenden Magnetisierungstrfer-Pfades: $\text{PTE} \approx k_{sw} \cdot T_{1w}$ (Zhou u. a., 2004).

2.3.1 Das Sättigungstrfer-Experiment

Das CEST-Experiment besteht aus einer Frequenz-selektiven Sättigungsphase und der anschließenden Aufnahme des modifizierten Wassersignals (Abbildung 2.9). Als Sättigung eines Spin- $\frac{1}{2}$ -Ensemble wird die kontinuierliche Angleichung der Besetzungszahlen der beiden Energiezustände $|\alpha\rangle$ und $|\beta\rangle$ bezeichnet. Die makroskopische Magnetisierung eines komplett gesättigten Spin-Ensembles ist somit Null. Frequenz-selektive Sättigung eines Pools kann mittels kontinuierlicher RF-Einstrahlung (engl. *continuous wave*, cw) der Dauer t_{sat} und Amplitude B_1 realisiert werden (cw Sättigung). Die Selektivität des RF-Pulses in der Frequenzdomäne ist dabei proportional zum Inversen der Pulsdauer: $\Delta\nu \approx \frac{1}{t_{sat}}$. Während der RF-Einstrahlung mit der Frequenz ω_{RF} wird die Sättigung über die in Abschnitt 2.2 beschriebenen Magnetisierungstrfer-Pfade auf den Wasser-Pool w übertragen. Die Akkumulation der Sättigung im Wassersignal führt hierbei zu der Signalverstärkung PTE. Anschließend wird die z-Komponente des modifizierten Wassersignals $M_{zw}(\omega_{RF})$ aufgenommen. Eine Wiederholung der Sättigung bei diversen Frequenzoffsets und Normierung des detektierten Wassersignals mit der thermischen Gleichgewichtsmagnetisierung M_w^0 führt zum sogenannten Z-Spektrum:

$$Z(\Delta\omega) = \frac{M_{zw}(\Delta\omega)}{M_w^0} \quad (2.35)$$

mit dem Frequenzoffset des RF-Sättigungspulses $\Delta\omega = \omega_{RF} - \omega_w$, wodurch das Z-Spektrum auf das Wassersignal referenziert ist.

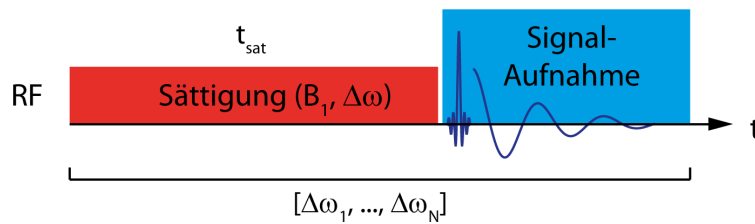


Abbildung 2.9: Die CEST-Pulssequenz besteht aus einer Sättigungsphase (roter Bereich) und der anschließenden Aufnahme des modifizierten Wassersignals (blauer Bereich). Frequenzselektive Sättigung beim Frequenzoffset $\Delta\omega$ kann mittels kontinuierlicher RF-Einstrahlung der Dauer t_{sat} und der Amplitude B_1 realisiert werden. Für die Aufnahme eines Z-Spektrums mit der Abtastung N muss die Sequenz mehrmals wiederholt werden.

Je nachdem, ob es sich bei der Aufnahmephase des Wassersignals um eine vergleichsweise einfache Detektion des FID oder eine bildgebende NMR-Pulssequenz handelt, spricht man entweder von CEST-Spektroskopie oder CEST-Bildgebung (Unterabschnitt 3.2.1). Bei der CEST-Bildgebung erhält man somit ein Z-Spektrum pro Voxel im MR-Bild (Abbildung 2.10). Aufgrund von RF-Limitationen an Ganzkörper-MR-Tomographen wird im Fall einer CEST-Bildgebung die Sättigung durch mehrere hintereinander folgende RF-Pulse realisiert (gepulste Sättigung).

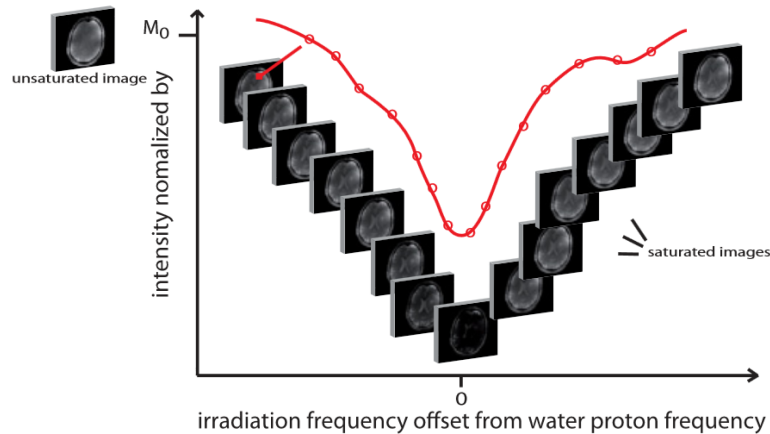


Abbildung 2.10: Bei der CEST-Bildgebung wird ein MR-Bild pro Frequenzoffset im Z-Spektrum aufgenommen. Die Normierung dieser Bilder mittels einer ungesättigten Aufnahme des Wassersignals (thermische Gleichgewichtsmagnetisierung) ergibt ein Z-Spektrum pro Voxel im MR-Bild. Die Abbildungen wurden aus (Zaiss und Bachert, 2013a) übernommen.

2.3.2 Endogene CEST-Signale

Bei Durchführung eines CEST-Experiments in lebendem Gewebe (*in vivo*) sind diverse sich überlappende Magnetisierungstransfer-Effekte (Abschnitt 2.2) im Z-Spektrum detektierbar (Abbildung 2.11). Im Folgenden sind die in verschiedenen Abschnitten des Z-Spektrums dominanten CEST-Effekte aufgelistet.

- **Direkte Wassersättigung (DS):**
Durch RF-Einstrahlung nahe der Resonanzfrequenz des Wassersignals wird dieses komplett gesättigt ($Z(\Delta\omega = 0) \approx 0$). Im Z-Spektrum ist die DS im Bereich zwischen ca. ± 1 ppm dominant.
- **Magnetisierungstransfer rigider makromolekularer Strukturen (ssMT):**
Der ssMT ist als sehr breite Resonanz im Bereich zwischen ca. ± 30 ppm im Z-Spektrum detektierbar. Das Maximum des Peaks liegt bei $\Delta\omega \approx -3,5$ ppm.
- **Chemischer Austausch (CA):**
Selektive CEST-Effekte von chemisch austauschenden Protonen in mobilen Makromolekülen oder Metaboliten resonieren im Bereich von $+0,5$ bis $+5,0$ ppm.

- Exchange-relayed NOE (rNOE):

rNOE-Signale von nicht austauschenden aliphatischen Protonen in mobilen Makromolekülen dominieren den Bereich zwischen $-0,5$ und $-6,0$ ppm im Z-Spektrum. Zusätzlich sind rNOE-Signale von fest gebundenen aromatischen Protonen im positiven Frequenzbereich des Z-Spektrums präsent. Der Beweis für die Existenz dieser rNOE-Signale von aromatischen Protonen ist Gegenstand dieser Arbeit (siehe Ergebnisteil, Abbildung 4.6).

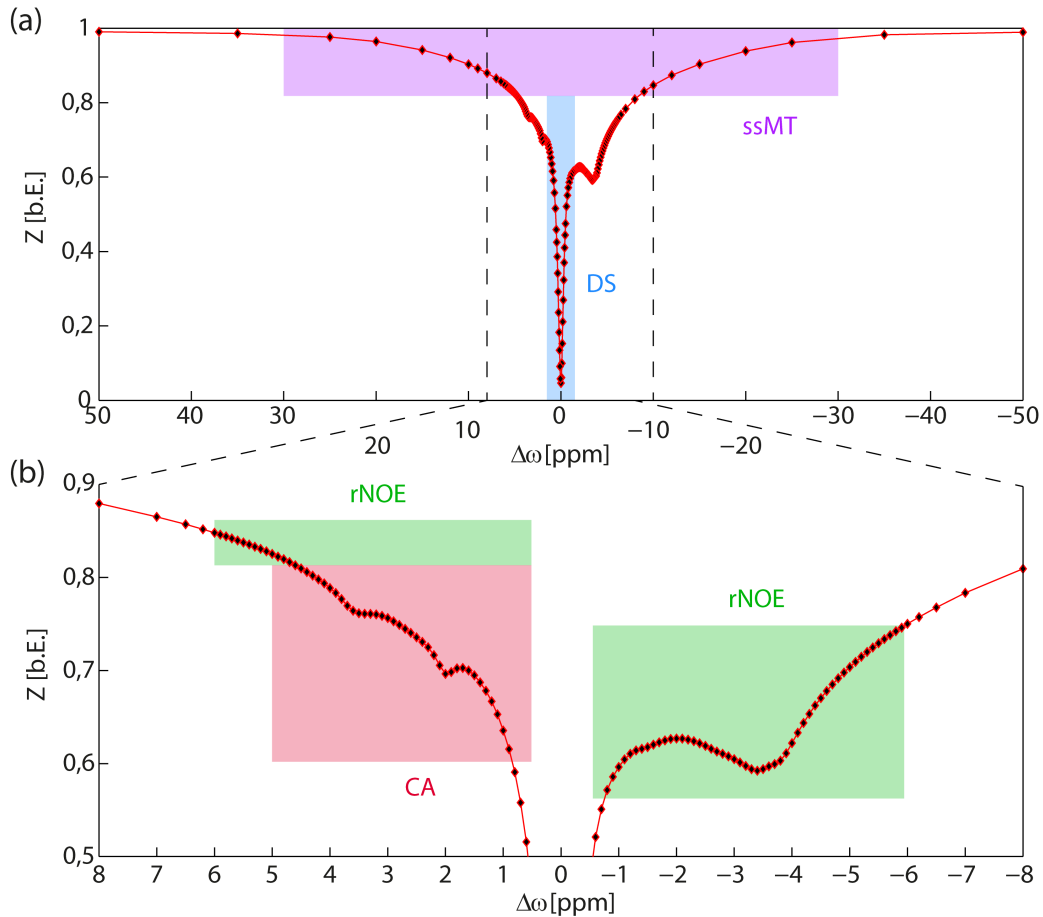


Abbildung 2.11: Exemplarisches *in vivo* Z-Spektrum bei $B_0 = 14,1$ T. (a) Kompletter Frequenzbereich endogener CEST-Signale. (b) Frequenzbereich selektiver Signale von mobilen Makromolekülen und Metaboliten.

Z-Spektren die mit einer Sättigungszeit t_{sat} aufgenommen wurden, welche kürzer ist, als die Zeit die das Wassersignal benötigt um in den thermischen Gleichgewichtszustand zurückzukehren $t \approx 5 \cdot T_{1w}$, weisen zudem selbst bei großen Frequenzoffsets einen Z-Wert kleiner Eins auf.

2.3.3 CEST-Theorie

Im Folgenden wird zunächst der zeitliche Verlauf der z-Magnetisierung des Wassers, das im Magnetisierungstransfer mit lediglich einem anderen Pool steht, analytisch dargestellt. Die Er-

weiterung dieser Theorie auf ein Multi-Pool-System liefert eine gute mathematische Beschreibung realer Z-Spektren von lebendem Gewebe.

Bloch-McConnell-Gleichungen

Die mathematische Formulierung der zeitlichen Entwicklung der Magnetisierungsvektoren \vec{M}_w und \vec{M}_s eines Zwei-Pool-Systems, das im Magnetisierungstransfer zueinander steht, wurde erstmals von McConnell aufgestellt (McConnell, 1958). Bei den sogenannten Bloch-McConnell-Gleichungen (BM-Gleichungen) handelt es sich um die konventionellen Bloch-Gleichungen (2.20 bis 2.22) im mit ω_{RF} rotierenden Koordinatensystem, die um die Austauschsterme $\pm k_{ij}M_{li}$ (mit $i, j = w, s$ und $l = x, y, z$) erweitert wurden:

$$\frac{dM_{xw}}{dt} = -\Delta\omega M_{yw} - R_{2w}M_{xw} - k_{ws}M_{xw} + k_{sw}M_{xs} \quad (2.36)$$

$$\frac{dM_{yw}}{dt} = +\Delta\omega M_{xw} - R_{2w}M_{yw} + \omega_1 M_{zw} - k_{ws}M_{yw} + k_{sw}M_{ys} \quad (2.37)$$

$$\frac{dM_{zw}}{dt} = -\omega_1 M_{yw} - R_{1w}(M_{zw} - M_w^0) - k_{ws}M_{zw} + k_{sw}M_{zs} \quad (2.38)$$

$$\frac{dM_{xs}}{dt} = -\Delta\omega_s M_{ys} - R_{2s}M_{xs} - k_{sw}M_{xs} + k_{ws}M_{xw} \quad (2.39)$$

$$\frac{dM_{ys}}{dt} = +\Delta\omega_s M_{xs} - R_{2s}M_{ys} + \omega_1 M_{zs} - k_{sw}M_{ys} + k_{ws}M_{yw} \quad (2.40)$$

$$\frac{dM_{zs}}{dt} = -\omega_1 M_{ys} - R_{1s}(M_{zs} - M_s^0) - k_{sw}M_{zs} + k_{ws}M_{zw} \quad (2.41)$$

mit der Gleichgewichtsbedingung:

$$k_{sw}M_s^0 = k_{ws}M_w^0 \quad (2.42)$$

und den Austauschraten k_{ij} ($i, j = w, s$) eines beliebigen Magnetisierungstransfer-Mechanismus vom Pool i nach j . Die Relaxationsraten $R_{ij} = \frac{1}{T_{ij}}$ sind die Inversen der longitudinalen ($i = 1$) und transversalen ($i = 2$) Relaxationszeiten T_{ij} des jeweiligen Pool $j = w$ und s . Die Amplitude des beim Frequenzoffset $\Delta\omega$ eingestrahlten RF-Feldes ist $B_1 = \frac{\omega_1}{\gamma}$. Der Frequenzoffset des eingestrahlten RF-Feldes vom Pool s $\Delta\omega_s = \omega_{RF} - \omega_s = \Delta\omega - \delta\omega_s$ ist bei on-resonanter Einstrahlung ($\omega_{RF} = \omega_s \Leftrightarrow \Delta\omega = \delta\omega_s$) gleich Null.

In diesem Kontext wird das Protonen-Verhältnis f_s (engl. *proton fraction*) mit Hilfe der thermischen Gleichgewichtsmagnetisierungen M_s^0 und M_w^0 definiert als:

$$f_s = \frac{M_s^0}{M_w^0} = \frac{k_{ws}}{k_{sw}} \quad (2.43)$$

Unter Verwendung der allgemeinen Darstellung der Magnetisierung (Gleichung 2.12) kann f_s durch die Gesamtanzahl N_i der Protonen in den beiden Pools $i = w$ und s dargestellt werden. Folglich ist f_s eine Funktion der Molekülkonzentration c_i und der Anzahl n_i an Protonen des jeweiligen Pools pro Molekül:

$$f_s = \frac{N_s}{N_w} = \frac{n_s \cdot c_s}{n_w \cdot c_w} \quad (2.44)$$

Analytische Lösung der Bloch-McConnell-Gleichungen

Bei den BM-Gleichungen handelt es sich um ein gekoppeltes System von Differentialgleichungen erster Ordnung. Dieses kann auf elegante Weise mittels eines Eigenraum-Ansatzes analytisch gelöst werden (Abergel und Palmer, 2004; Zaiss und Bachert, 2013b,a). Dabei wurde gezeigt, dass während einer RF-Einstrahlung der Dauer $t_{sat} \gg T_{2w}$, der einzig signifikante Beitrag vom verbleibenden Magnetisierungsvektor des Wassers \vec{M}_w kollinear zum Eigenvektor \vec{v}_1 ist, welcher durch den betragsmäßig kleinsten zugehörigen Eigenwert λ_1 ausgezeichnet ist. Dieser Eigenvektor \vec{v}_1 ist kollinear zum effektiven magnetischen Feld \vec{B}_{eff} (Gleichung 2.19, Abbildung 2.12). Der Eigenwert λ_1 der BM-Gleichungen ist identisch zu $-R_{1\rho}$, der negativen longitudinalen Relaxationsrate im rotierenden System (Trott und Palmer III, 2002; Zaiss und Bachert, 2013b). Während des Sättigungspulses im CEST-Experiment zerfällt die Wassermagnetisierung folglich entlang der Achse des effektiven magnetischen Feldes mit der Rate $R_{1\rho}$. Aufgrund der Tatsache, dass bei der Eigenraum-Analyse lediglich λ_1 wichtig ist, können die BM-Gleichungen im Eigenraum durch ein eindimensionales System beschrieben werden, welches direkt gelöst werden kann.

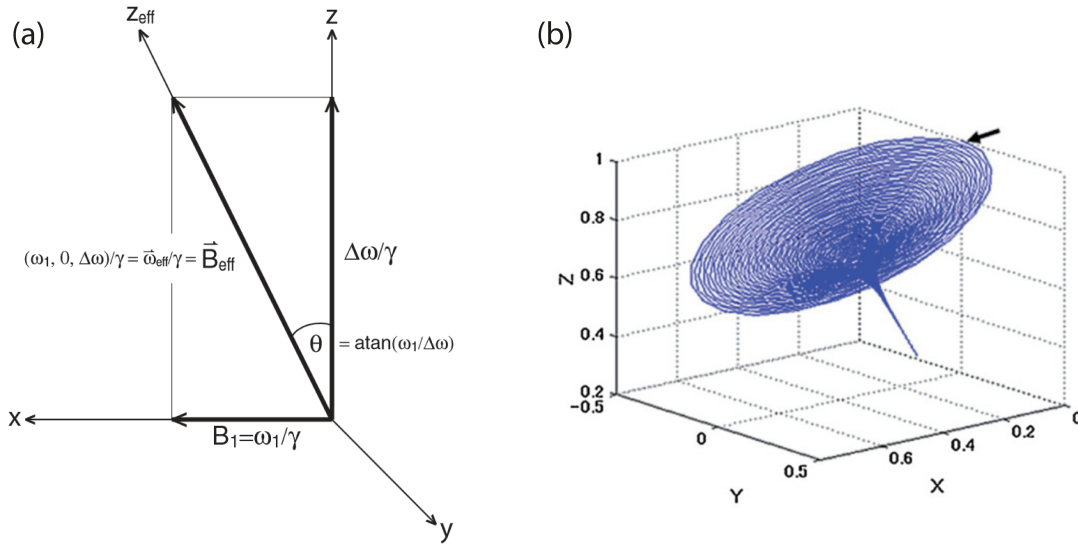


Abbildung 2.12: (a) Das effektive magnetische Feld \vec{B}_{eff} während der Einstrahlung eines RF-Feldes beim Frequenzoffset $\Delta\omega$ und der Amplitude B_1 . Für den Winkel θ zwischen den beiden Koordinaten z und z_{eff} gilt: $\cos^2\theta = \frac{\Delta\omega^2}{\Delta\omega^2 + \omega_1^2}$ bzw. $\sin^2\theta = \frac{\omega_1^2}{\omega_1^2 + \Delta\omega^2}$. (b) Simulation der Trajektorie der Wassermagnetisierung \vec{M}_w unter RF-Einstrahlung beim Frequenzoffset des Pool s ($\Delta\omega = \delta\omega_s$). Die mit \vec{B}_{eff} nicht kollineare Komponente von \vec{M}_w zerfällt sehr schnell, wodurch eine mit der Rate $R_{1\rho}$ abnehmende Wassermagnetisierung entlang des effektiven magnetischen Feldes angenommen werden kann. Beide Illustrationen sind im mit ω_{RF} rotierenden Koordinatensystem (x, y, z) . Die Abbildungen wurden aus (Zaiss und Bachert, 2013a; Murase, 2012) übernommen.

Mittels der Eigenraum-Analyse berechnet sich die zeitliche Entwicklung des Z-Spektrums (Glei-

2 Grundlagen

chung 2.35) nach der Sättigungsdauer t_{sat} zu:

$$Z(\Delta\omega, t_{sat}) = [Z_i \cos^2 \theta(\Delta\omega) - Z^{ss}(\Delta\omega)] e^{-R_{1\rho}(\Delta\omega) t_{sat}} + Z^{ss}(\Delta\omega) \quad (2.45)$$

mit dem Winkel $\theta(\Delta\omega)$ zwischen der z-Achse und dem effektiven magnetischen Feld $\vec{B}_{eff}(\Delta\omega)$. Die Funktion beschreibt einen mono-exponentiellen Zerfall der anfänglichen Z-Magnetisierung Z_i mit der Rate $R_{1\rho}(\Delta\omega)$ zum Gleichgewichtszustand (engl. *steady state*, ss)

$$Z^{ss}(\Delta\omega) = \frac{R_{1w} \cos^2 \theta(\Delta\omega)}{R_{1\rho}(\Delta\omega)} \quad (2.46)$$

Im Fall eines Wasser-Pools, der im Magnetisierungstransfer mit nur einem anderen Pool steht, setzt sich die longitudinale Relaxationsrate im rotierenden System $R_{1\rho}$ aus der effektiven Relaxationsrate durch direkte Wassersättigung R_{eff} und der Austausch abhängigen Relaxationsrate R_{ex} zusammen:

$$R_{1\rho}(\Delta\omega) = R_{eff}(\Delta\omega) + R_{ex}(\Delta\omega) \quad (2.47)$$

R_{eff} kann dabei durch die nachfolgende Funktion angenähert werden (Trott und Palmer III, 2002):

$$R_{eff}(\Delta\omega) = R_{1w} \cos^2 \theta(\Delta\omega) + R_{2w} \sin^2 \theta(\Delta\omega) \quad (2.48)$$

$$= R_{1w} + (R_{2w} - R_{1w}) \frac{\omega_1^2}{\omega_1^2 + \Delta\omega^2} \quad (2.49)$$

Somit ist das Z-Spektrum im Gleichgewichtszustand, das lediglich durch die direkte Sättigung des Wasserpools hervorgerufen wird, gegeben durch:

$$Z_{DS}^{ss} = \frac{R_{1w} \cos^2 \theta}{R_{eff}} = 1 - \underbrace{\frac{(\Gamma_{DS}/2)^2}{(\Gamma_{DS}/2)^2 + \Delta\omega^2}}_{=\mathcal{L}_{DS}(\Delta\omega)} \quad (2.50)$$

\mathcal{L}_{DS} ist eine Lorentz-förmige Funktion von $\Delta\omega$ mit der Halbwertsbreite $\Gamma_{DS} = 2\omega_1 \sqrt{\frac{R_{2w}}{R_{1w}}}$.

R_{ex} hingegen ist eine komplizierte Funktion diverser Parameter, die sich jedoch im Spezialfall einer großen chemischen Verschiebung des Pool s gegenüber dem Wassersignal (engl. *large shift limit*, LS) ($\delta\omega_s \gg \omega_1$) stark vereinfachen lässt. Diese Näherung ist für CEST-Effekte, die in dieser Arbeit evaluiert werden, erfüllt.

$$R_{ex}(\Delta\omega) \approx R_{ex,LS}(\Delta\omega) = R_{ex,LS}^{max} \frac{(\Gamma_s/2)^2}{(\Gamma_s/2)^2 + (\Delta\omega - \delta\omega_s)^2} \quad (2.51)$$

ist eine Lorentz-förmige Funktion von $\Delta\omega$ an der Stelle $\delta\omega_s$ mit der Halbwertsbreite:

$$\Gamma_s = 2\sqrt{\frac{R_{2s} + k_{sw}}{k_{sw}} \omega_1^2 + (R_{2s} + k_{sw})^2} \quad (2.52)$$

und der Amplitude:

$$R_{ex,LS}^{max} = f_s k_{sw} \underbrace{\frac{\omega_1^2}{\omega_1^2 + k_{sw}(k_{sw} + R_{2s})}}_{=\alpha(\omega_1)} \quad (2.53)$$

Die Sättigungseffizienz α (engl. *labeling efficiency*) kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen und ist ein Maß für die Effektivität einer Sättigung mit der RF-Amplitude B_1 , bei einer gegebenen Austauschrate k_{sw} (Abbildung 2.13). Allgemein wird mit einer steigenden Austauschrate ein höheres B_1 benötigt, um eine effektive Sättigung zu erreichen. Da jedoch auch die Linienbreiten des CEST-Effekts (Gleichung 2.52), sowie auch der DS (Gleichung 2.50) näherungsweise linear in B_1 sind, kann für eine gegebene Austauschrate jeweils ein optimales B_1 gefunden werden. Das Optimum zeichnet sich dabei durch eine größtmögliche Effektstärke, sowie Selektivität aus. Bei on-resonanter Einstrahlung auf den Pool s ($\Delta\omega = \delta\omega_s \Leftrightarrow \Delta\omega_s = 0$) gilt somit:

$$R_{ex,LS}^{on} = R_{ex,LS}^{max} = f_s k_{sw} \alpha \quad (2.54)$$

Das Maximum von $R_{ex,LS}^{on}$ als Funktion der Austauschrate liegt bei $k_{sw} = \omega_1$. Somit kann durch eine steigende Austauschrate lediglich im Bereich $k_{sw} < \omega_1$ ein Anstieg des CEST-Effekts beobachtet werden.

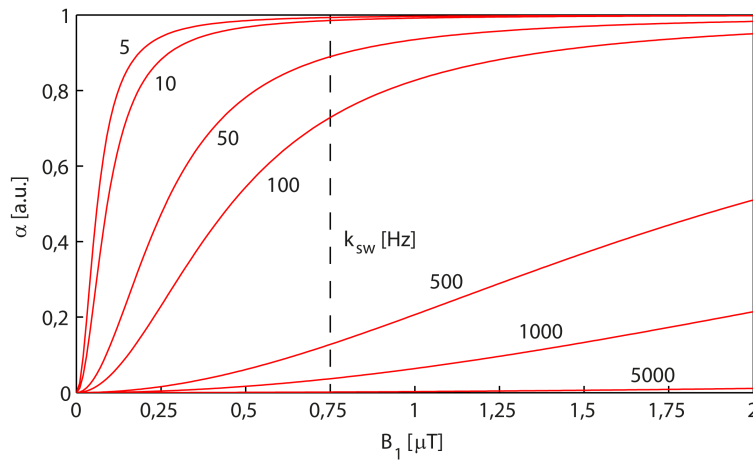


Abbildung 2.13: Die Sättigungseffizienz α als Funktion der RF-Amplitude B_1 bei diversen Austauschraten k_{sw} . Für die Abbildung wurde $R_{2s} = 50$ Hz angenommen. Mit steigendem R_{2s} ist eine abnehmende Sättigungseffizienz zu erwarten. Die gestrichelte Linie markiert die in dieser Arbeit häufig verwendete RF-Amplitude B_1 .

Multi-Pool-System

Bei CEST-Experimenten von lebendem Gewebe beobachtet man jedoch diverse Beiträge verschiedener Pools in den Z-Spektren (Unterabschnitt 2.3.2). Im Folgenden wird daher obige analytische Lösung der BM-Gleichungen auf ein Multi-Pool-System erweitert. Der Magnetisierungstransfer jedes einzelnen Pools i mit dem Wasser wird dabei durch die jeweilige Austausch abhängige Relaxationsrate $R_{ex,i}$ repräsentiert. Unter Annahme kleiner Poolgrößen (f_i im Bereich

2 Grundlagen

von einigen %) und eines vernachlässigbaren Magnetisierungstransfers zwischen den Pools i untereinander, können die einzelnen Beiträge in einer globalen longitudinalen Relaxationsrate zusammengefasst werden (Zaiss und Bachert, 2013b; Trott und Palmer III, 2004):

$$R_{1\rho} = R_{eff} + \sum_i R_{ex,i} \quad (2.55)$$

Die allgemeine Darstellung $R_{ex,i}$ eines Magnetisierungstransfer-Pfades zum Wasser differenziert dabei nicht zwischen den verschiedenen Transfermechanismen (ssMT, CA und rNOE, Abschnitt 2.2). Die globale longitudinale Relaxationsrate eines Multi-Pool-Systems kann daher auch als Summe der einzelnen Transfermechanismen dargestellt werden:

$$R_{1\rho} = R_{eff} + R_{ssMT} + \sum_i R_{CA,i} + \sum_j R_{rNOE,j} \quad (2.56)$$

Das Z-Spektrum (Gleichung 2.46) im Fall eines Multi-Pool-Systems ergibt sich somit zu:

$$Z^{ss} = \frac{R_{1w} \cos^2 \theta}{R_{eff} + R_{ssMT} + \sum_i R_{CA,i} + \sum_j R_{rNOE,j}} \quad (2.57)$$

Aufgrund der Annahme kleiner Beiträge der verschiedenen Pools zum Z-Spektrum kann Z^{ss} um die Stelle $R_{ssMT} + \sum_i R_{CA,i} + \sum_j R_{rNOE,j} = 0$ Taylor-entwickelt werden ($\frac{1}{c+x} = \frac{1}{c} - \frac{x}{c^2} + \dots$), sodass gilt (Zaiss und Bachert, 2013a):

$$Z^{ss} \approx \underbrace{\frac{R_{1w} \cos^2 \theta}{R_{eff}}}_{Z_{DS}^{ss} = 1 - \mathcal{L}_{DS}} - \frac{R_{1w} \cos^2 \theta}{R_{eff}^2} \left(R_{ssMT} + \sum_i R_{CA,i} + \sum_j R_{rNOE,j} \right) \quad (2.58)$$

Hierbei handelt es sich um das Z-Spektrum Z_{DS}^{ss} (Gleichung 2.50), das lediglich durch die direkte Wassersättigung hervorgerufen wird minus den Beiträgen der übrigen CEST-Effekte. Da für CEST-Effekte, die in dieser Arbeit evaluiert wurden das LS-Limit ($\delta\omega_s \gg \omega_1 \Rightarrow \cos^2 \theta \approx 1$) erfüllt ist, vereinfacht sich die Gleichung zu:

$$Z_{LS}^{ss} = 1 - \mathcal{L}_{DS} - \frac{1}{R_{1w}} \left(R_{ssMT} + \sum_i R_{CA,i} + \sum_j R_{rNOE,j} \right) \quad (2.59)$$

Bei den Austausch-abhängigen Relaxationsraten $R_{CA,i}$ und $R_{rNOE,j}$ handelt es sich um Lorentz-förmige Funktionen ($\mathcal{L}_{CA,i}, \mathcal{L}_{rNOE,j}$) des Frequenzoffsets $\Delta\omega$ (Gleichung 2.51). Der Beitrag des ssMT wird in der Literatur je nach Anwendung durch viele verschiedene Linienformen (zum Beispiel Gauß-, Lorentz- oder super Lorentz-förmige Funktionen) beschrieben (Zaiss u. a., 2015b). Bei den Auswertungen der Z-Spektren in dieser Arbeit war jedoch eine Approximation des ssMT mittels einer Lorentz-förmigen Funktion \mathcal{L}_{ssMT} am geeignetsten. Somit können Z-Spektren unter Vorkenntnis aller dominanten Beiträge durch einen Multi-Lorentz-Fit angenähert werden:

$$Z_{LS}^{ss} = 1 - \left(\mathcal{L}_{DS} + \mathcal{L}_{ssMT} + \sum_i \mathcal{L}_{CA,i} + \sum_j \mathcal{L}_{rNOE,j} \right) \quad (2.60)$$

Gepulste Sättigung

Im Folgenden wird eine gepulste Sättigung, wie sie bei der CEST-Bildgebung verwendet wird (Unterabschnitt 3.2.1), betrachtet. Der Sättigungszug besteht dabei aus mehreren RF-Pulsen der Dauer t_p , welche durch eine Pause t_d voneinander getrennt sind. Der Anteil der Pulsdauer im Vergleich zur Pause wird in diesem Kontext als *duty cycle* (DC) definiert:

$$DC = \frac{t_p}{t_p + t_d} \quad (2.61)$$

Die einzelnen RF-Pulse weisen ein Gauß-förmiges Profil auf mit einer mittleren RF-Amplitude:

$$B_{1,mean} = \frac{1}{t_p} \int_0^{t_p} B_1(t) dt \quad (2.62)$$

Unter Annahme eines Zerfalls der z-Magnetisierung des Wassers mit $R_{1\rho}$ während der RF-Pulse (Gleichung 2.45) und einer Relaxation mit R_{1w} (Gleichung 2.45) in den Pausen (Gleichung 2.24), stellt sich nach einer Sättigungszeit $t_{sat} \approx 5 \cdot T_{1w}$ nachfolgendes Gleichgewicht ein (Zaiss und Bachert, 2013a):

$$Z^{ssp}(\Delta\omega) = \frac{R_{1w} \cos\theta ((1 - DC) + DC \cdot \cos\theta)}{R_{1w}(1 - DC) + DC \cdot R_{1\rho}(\Delta\omega)} \quad (2.63)$$

Diese Gleichung ist jedoch nur für genügend große Austauschraten, bzw. lange Pulsdauern und Pausen erfüllt ($t_p, t_d \gg 1/(R_{1s} + k_{sw})$). Im Fall einer kontinuierlichen RF-Einstrahlung ($DC = 1$), ergibt sich wie erwartet $Z^{ss}(\Delta\omega)$ (Gleichung 2.46). Die Beschreibung eines Multi-Pool-Systems durch mehrere Lorentz-förmige Funktionen im LS-Limit (Gleichung 2.60) ist ebenfalls bei einer gepulsten Sättigung valide.

2.3.4 Isolierte Sättigungstransfer-Effekte (AREX-Signal)

Wie zuvor erwähnt sind im Z-Spektrum von lebendem Gewebe Effekte verschiedener Magnetisierungstransfer-Mechanismen präsent. Für eine quantitative Auswertung der selektiven CEST-Effekte von mobilen Makromolekülen oder Metaboliten (CA und rNOE) ist daher eine Separation dieser Signale vom ssMT, sowie von der direkten Wassersättigung notwendig. Im Gleichgewichtszustand, der sich nach einer Sättigungsdauer von $t_{sat} \approx 5 \cdot T_{1w}$ einstellt, ist dies nach obiger analytischer Beschreibung mittels einer Subtraktion inverser Z-Spektren möglich (Zaiss u. a., 2014). Im Folgenden wird ein allgemeines Z-Spektrum mit mehreren CEST-Effekten durch CA und rNOE, sowie einem kleinen Beitrag des ssMT betrachtet (Gleichung 2.57):

$$Z_{lab}^{ss} = \frac{R_{1w} \cos^2\theta}{R_{eff} + R_{ssMT} + \sum_i R_{CA,i} + \sum_j R_{rNOE,j}} \quad (2.64)$$

Mit Hilfe eines Referenzspektrums, das die Beiträge selektiver CEST-Effekte $R_{CA,i}$ und $R_{rNOE,j}$ nicht beinhaltet:

$$Z_{ref}^{ss} = \frac{R_{1w} \cos^2\theta}{R_{eff} + R_{ssMT}} \quad (2.65)$$

kann ein Magnetisierungstransfer-Kontrast (MTR) definiert werden, der frei von Einflüssen der direkten Wassersättigung, sowie des ssMT ist:

$$MTR_{Rex} = \frac{1}{Z_{lab}^{ss}} - \frac{1}{Z_{ref}^{ss}} = \frac{\sum_i R_{CA,i} + \sum_j R_{rNOE,j}}{R_{1w} \cos^2\theta} \quad (2.66)$$

2 Grundlagen

Betrachtet man lediglich CEST-Effekte im LS-Limit ($\delta\omega_s \gg \omega_1 \Rightarrow \cos^2\theta \approx 1$), so kann dieser Korrekturansatz erweitert werden, um ebenfalls den Einfluss der T_1 -Relaxation des Wassersignals zu korrigieren:

$$AREX = R_{1w} \left(\frac{1}{Z_{lab}^{ss}} - \frac{1}{Z_{ref}^{ss}} \right) = R_{1w} \cdot MTR_{Rex} \quad (2.67)$$

$$= \sum_i \underbrace{R_{CA,i}}_{AREX_{CA,i}} + \sum_j \underbrace{R_{rNOE,j}}_{AREX_{rNOE,j}} \quad (2.68)$$

Hierbei handelt es sich um einen quantitativen Parameter isolierter Magnetisierungstransfer-Effekte (CA und rNOE), der im Englischen *apparent exchange-dependent relaxation* (AREX) genannt wird (Zaiss u. a., 2014). Die einzelnen Beiträge zum AREX-Signal verhalten sich dabei additiv. Für einen isolierten CEST-Pool s gilt bei on-resonanter Sättigung:

$$AREX = R_{ex,LS}^{on} = f_s k_{sw} \alpha \quad (2.69)$$

Im Fall einer gepulsten Sättigung handelt es sich beim AREX-Signal ebenfalls um einen quantitativen Parameter. Hierbei gilt:

$$AREX_{pulsed} = DC \cdot AREX_{cw} \quad (2.70)$$

2.4 Proteine

Proteine sind Makromoleküle, die praktisch in allen biologischen Prozessen eine essenzielle Rolle spielen. Je nach Struktur können diese zum Beispiel als Katalysator, Transporter, Stabilisator oder auch Regulator fungieren. Die Gesamtheit aller Proteine in einer Zelle, einem Organismus oder Lebewesen wird als Proteom bezeichnet. Im Menschen umfasst dieses mehrere 100.000 verschiedene Proteinspezies. Hergestellt werden diese per Biosynthese in sogenannten Ribosomen im Zellinneren. Die Information über die individuelle Struktur eines jeden Proteins wird dabei von der Erbinformation (DNA) des jeweiligen Organismus abgelesen. Das Proteom steht in einem Gleichgewicht eines ständigen Abbaus von beschädigten Proteinen und der Neusynthese von zu einem bestimmten Zeitpunkt unverzichtbaren Proteinen. Die in diesem Abschnitt behandelten Themen basieren auf den Büchern (Stryer, 1996; Tiidus u. a., 2012; Wuethrich, 1986).

2.4.1 Aufbau und Struktur von Proteinen

Unabhängig von der Funktionalität eines Proteins, kann der Aufbau aller Proteine wie folgt verallgemeinert werden. Proteine bestehen aus einer oder mehrerer Polypeptidketten, welche wiederum aus 20 verschiedenen Bestandteilen aufgebaut sind, den Aminosäuren (Abbildung 2.14). Die charakteristische Abfolge von Aminosäuren eines jeden Proteins ist dabei maßgeblich für dessen dreidimensionale Struktur und somit ausschlaggebend für dessen biologische Funktion. Innerhalb des Proteins kann es zur Ausbildung einzelner Domänen kommen, die sich durch Bereiche verschiedener Beweglichkeit auszeichnen. Somit handelt es sich bei einem Protein nicht um ein rigides Gerüst, sondern um ein bewegliches Makromolekül mit aktiven Zentren, die von einem ständigen Strukturwechsel geprägt sind. Im Allgemeinen kann folgende Gliederung der Struktur in vier verschiedene Ebenen vorgenommen werden (Abbildung 2.15):

- (a) Primärstruktur:
Sequenz der Aminosäuren. Durch Verknüpfung der einzelnen Aminosäuren entsteht eine sich wiederholende Abfolge $-(NH)-(CHR_i)-(CO)-$ entlang einer Polypeptidkette, welches als Rückgrat (engl. *backbone*, bb) eines Proteins bezeichnet wird. Die Verknüpfung beruht auf einer starren kovalenten Bindung und ist als Peptidbindung bekannt. Aufgrund der Beweglichkeit einzelner chemischer Gruppen innerhalb einer Aminosäure, weist die Polypeptidkette trotzdem eine hohe Flexibilität auf.
- (b) Sekundärstruktur:
Räumliche Anordnung von nahe aneinander liegenden Aminosäureresten zu sich wiederholenden Substrukturen. Diese werden durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Wasserstoff- und Sauerstoffatomen im Rückgrat des Proteins hervorgerufen. Die α -Helix und das β -Faltblatt sind dabei die am häufigsten auftretenden Substrukturen. Abschnitte entlang des Protein-Rückgrats ohne Sekundärstruktur werden aus dem Englischen als *Random Coil* bezeichnet.
- (c) Tertiärstruktur:
Dreidimensionale Anordnung von Sekundärstrukturen und *Random Coil* Abschnitten zu einer Einheit, welche die Funktionalität des Proteins bestimmt. Die Stabilität dieser spezifischen Konfiguration wird durch verschiedenste Bindungen und Kräfte ermöglicht. Dazu gehören die vergleichsweise starken jedoch raren kovalenten Disulfidbrücken, Was-

2 Grundlagen

serstoffbrückenbindungen, elektrostatische Wechselwirkungen von Ionen, oder der sogenannte hydrophobe Effekt.

(d) Quartärstruktur:

Anordnung mehrerer Tertiärstrukturen zu einem oligomeren Protein, das mehrere funktionelle Zentren aufweisen kann. Die einzelnen Polypeptidketten werden dabei durch nicht-kovalente Wasserstoffbrückenbindungen oder elektrostatische und hydrophobe Effekte zusammengehalten.

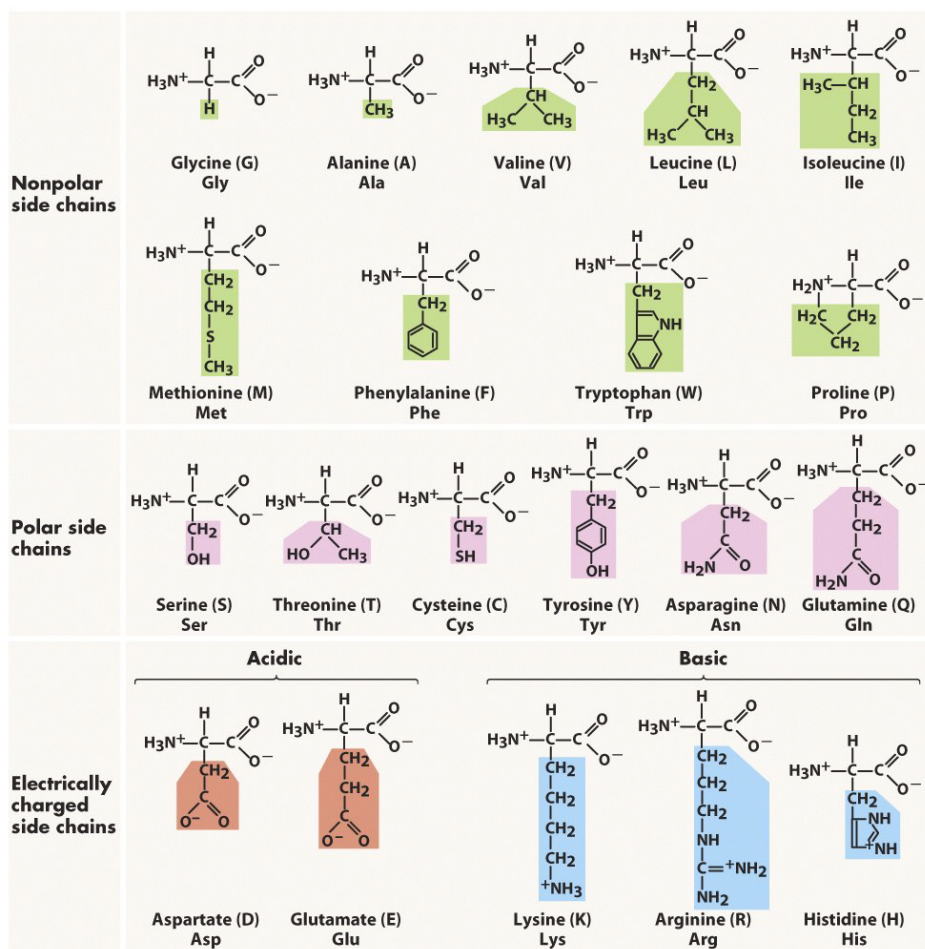


Abbildung 2.14: Gliederung der 20 verschiedenen Aminosäuren in drei Untergruppen mit unpolaren, polaren oder elektrisch geladenen Seitenketten. Neben der Bezeichnung der einzelnen Aminosäuren ist ebenfalls der jeweilige Ein- als auch Drei-Buchstaben-Code aufgeführt. Die Abbildung wurde aus (Freeman, 2005) übernommen.

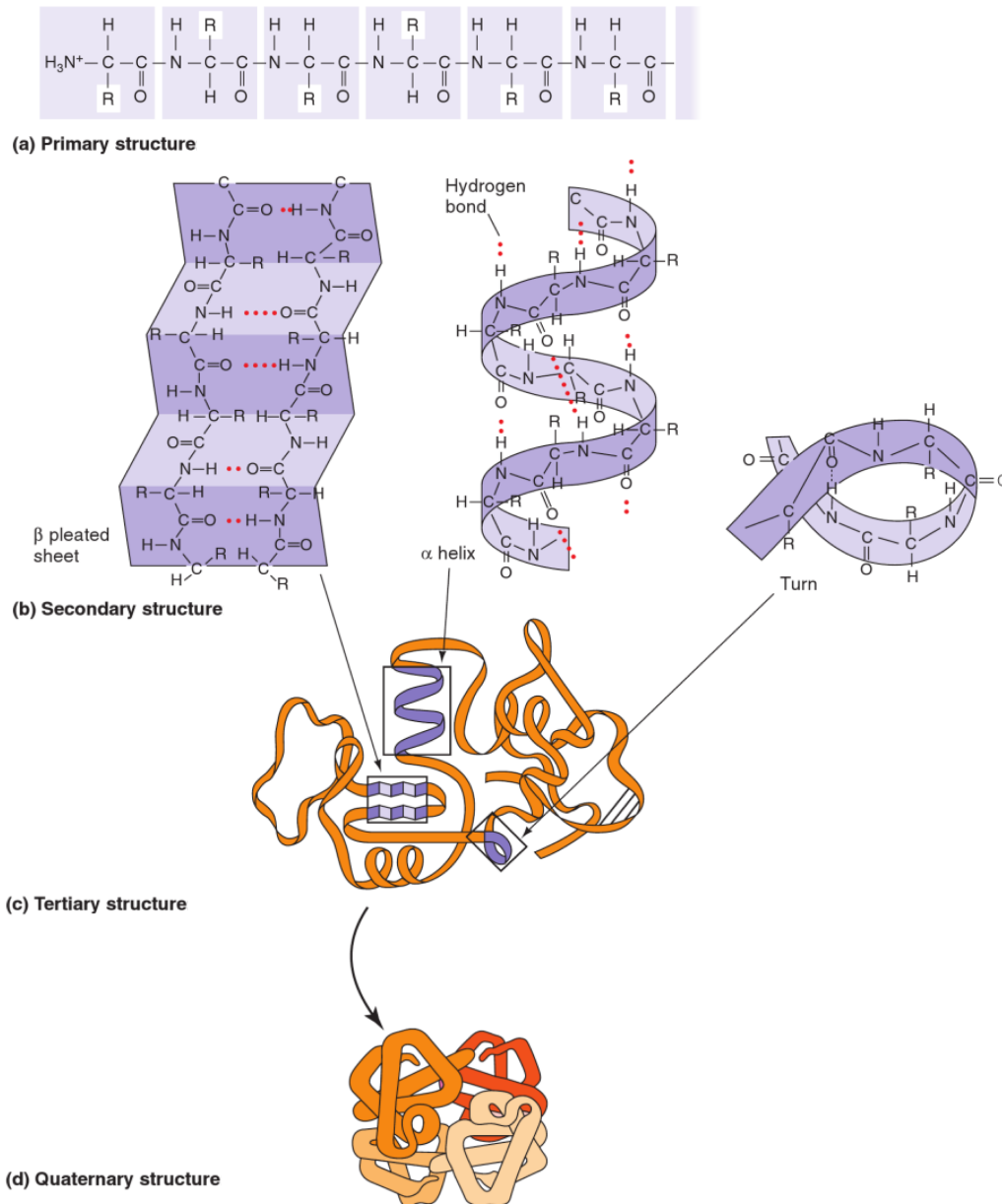


Abbildung 2.15: Illustration der vier verschiedenen Strukturebenen (a) - (d) von Proteinen. Die Abbildung wurde aus (Tropp, 2008) übernommen.

Aufgrund der Primärstruktur alleine, kann jedoch in den meisten Fällen nicht auf die Tertiär- oder Quartärstruktur eines Proteins geschlossen werden. Die im lebenden Organismus natürlich vorkommende und funktionell aktive Struktur eines Proteins wird nativer Faltungszustand genannt. Für die korrekte Faltung der Polypeptidketten in den jeweiligen nativen Faltungszustand sind sogenannte Chaperone verantwortlich, bei denen es sich ebenfalls um Proteine handelt. Diese können ebenfalls als Reparatereinheiten fungieren, damit denaturierte Proteine nicht abgebaut und neu synthetisiert, sondern effizient repariert werden können.

2.4.2 Denaturierung

Unter der Denaturierung eines Proteins versteht man eine fortschreitende Veränderung der Proteinstruktur und den damit verbundenen Verlust der nativen Faltungskonfiguration. In den meisten Fällen hat dies die Beendigung der biologischen Funktion des jeweiligen Proteins zur Folge. Die Denaturierung von Proteinen kann prinzipiell in zwei verschiedene Phasen bzw. Mechanismen unterteilt werden:

- **Entfaltung:**
Dieser Prozess beschreibt die Auflösung der nativen Proteinstruktur hin zu einer ungefalteten Polypeptidkette. Dabei werden schwache nicht kovalente Bindungen, die für die Bildung der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur verantwortlich sind, getrennt. Chemische Gruppen die im nativen Faltungszustand im Inneren des Proteins verborgen sind, erhalten somit direkten Kontakt zum umliegenden Wasser. Die vergleichsweise starken kovalenten Verknüpfungen der einzelnen Aminosäuren entlang des Rückgrats bleiben jedoch erhalten, wodurch die Primärstruktur der Proteine unter Entfaltung nicht verändert wird.
- **Aggregation:**
Hierunter versteht man das Zusammenklumpen von mehreren entfalteten Proteinen zu rigiden Strukturen makromolekularer Komplexe. Dieser Prozess beruht auf der Anziehung von freiliegenden hydrophoben Aminosäuren im entfalteten Zustand, die normalerweise im Inneren der Proteine verborgen sind. Ab einer kritischen Größe der aggregierten Komplexe, werden diese unlöslich und fallen aus.

Denaturierung kann durch verschiedenste Einflüsse wie z.B. Hitze, Druck, Detergenzien, extreme pH-Werte, etc. verursacht werden.

2.4.3 CEST-Effekte von Proteinen

Betrachtet man eine bestimmte Gruppe von Protonen, die in verschiedenen Aminosäuren auftritt, so variiert dessen chemische Verschiebung je nach Umfeld der Protonen (z.B. Polarität oder Ladung der jeweiligen Aminosäure). Außerdem können benachbarte Aminosäuren ebenfalls einen Einfluss auf die chemische Verschiebung haben. Somit beobachtet man eine Dispersion im NMR-Spektrum der ^1H -Signale identischer chemischer Gruppen in Proteinen (Abbildung 2.16). Eine genaue Auflistung der chemischen Verschiebungen aller auftretenden Protonen in den einzelnen Aminosäuren ist für den Fall eines *Random Coil* Proteinabschnittes in (Wuethrich, 1986) zu finden.

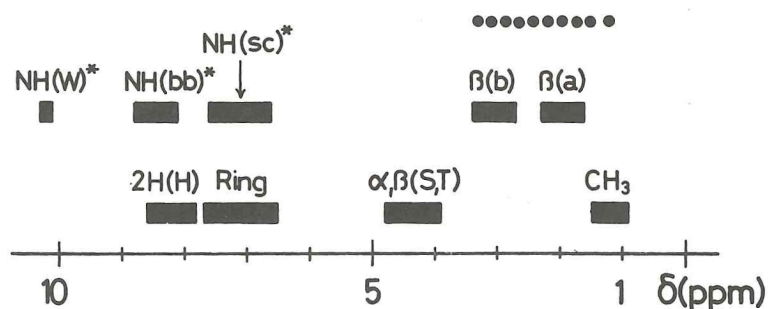


Abbildung 2.16: Illustration der charakteristischen Bereiche im NMR-Spektrum von bestimmten chemischen Gruppen in Proteinen. Die Frequenzachse weist die übliche Darstellung in der ^1H -NMR auf, wobei die Wasserresonanz bei 4,7 ppm liegt. Im Folgenden sind die Beiträge der einzelnen Aminosäuren (Ein-Buchstaben-Code) zu den markierten Bereichen aufgelistet:

| Code | Chem. Gruppe | Aminosäuren |
|-----------------------|---|------------------------------------|
| CH ₃ | CH ₃ | V, T, L, I, M |
| $\beta(a)$ | C^βH | V, I, L, E, Q, M, P, R, K |
| $\beta(b)$ | C^βH | C, D, N, F, Y, H, W |
| $\alpha, \beta(S, T)$ | $\text{C}^\alpha\text{H}, \text{C}^\beta\text{H}$ | S, T |
| ••• | andere aliphatische CH | ... |
| Ring | aromatische CH | F, Y, W, H(C^4H) |
| 2H(H) | aromatische CH | H(C^2H) |
| NH(W)* | Indol-Ring NH | W |
| NH(sc)* | Seitenketten NH_x | N, Q, K, R |
| NH(bb)* | NH | Rückgrat |

Chemisch austauschende Protonen sind mit einem * gekennzeichnet. Die Abbildung wurde aus (Wuethrich, 1986) übernommen.

Der Bereich chemisch austauschender Protonen in den Seitenketten von Proteinen (NH(sc)*) liegt zwischen 1,8 und 2,9 ppm relativ zur Wasserresonanz. Dieser Bereich lässt sich mittels der zuvor erwähnten genaueren Auflistung der einzelnen chemischen Verschiebungen in zwei getrennte Abschnitte untergliedern:

- 1,8 – 2,2 ppm: Guanidinium-Protonen ($(\text{NH}_2)_2^+$) von R
- 2,2 – 2,9 ppm: Amin-Protonen (CONH_2 und NH_3^+) von N, Q und K

In der CEST-Spektroskopie ist prinzipiell ein Magnetisierungstransfer von allen in Abbildung 2.16 dargestellten Protonen zum Wassersignal zu erwarten. Fest gebundene aliphatische und aromatische Protonen treten dabei als rNOE-Signale (Unterabschnitt 2.2.3) in Erscheinung und chemisch austauschende an Stickstoff gebundene Protonen als CA-Signale (Unterabschnitt 2.2.1). Für die Stärke der einzelnen CEST-Effekte ist in erster Linie die relative Häufigkeit der jeweiligen Aminosäuren in einem Protein oder auch Proteom ausschlaggebend. Aufgrund des Vorkommens jeweils eines Amid-Protons (NH(bb)*) pro Peptidbindung, unabhängig vom

2 Grundlagen

Typ der Aminosäuren, kann ein dominantes CEST-Signal dieser Protonen beobachtet werden. Der CEST-Effekt von Amid-Protonen spielt außerdem für die Detektion von Proteinen in lebendem Gewebe mittels CEST-Spektroskopie eine entscheidende Rolle. Grund hierfür ist die eindeutige Zuordnung von chemisch austauschenden Protonen mit einer Resonanzfrequenz von $\Delta\omega = 3,5$ ppm zu eben diesen Amid-Protonen in den Peptidbindungen von Proteinen und Peptiden (Zhou u. a., 2003). Unter physiologischen Bedingungen weisen diese eine Austauschrate im Bereich von 50 Hz auf (Bodet u. a., 2015). Die Abhängigkeit der CA- und rNOE-Signale von zum Beispiel pH, Temperatur, Puffer, Größe und Beweglichkeit der Proteine, etc. ist in Abschnitt 2.2 beschrieben. Der Einfluss von Denaturierung auf die CEST-Signale von Proteinen ist Gegenstand dieser Arbeit.

3 Material und Methoden

3.1 NMR-Messsysteme

Alle spektroskopischen Messungen von Modelllösungen wurden mittels einem Ultrahochfeld-NMR-Spektrometer durchgeführt. Für bildgebende Aufnahmen wurde ein Ganzkörper-MR-Tomograph verwendet.

3.1.1 NMR-Spektrometer

Das NMR-Spektrometer Avance II (Abbildung 3.1) mit einer Magnetfeldstärke von $B_0 = 14,09\text{T}$ ist ein Produkt der Firma Bruker (Bruker, Karlsruhe-Rheinstetten, Deutschland). Die experimentell ermittelte ^1H -Resonanzfrequenz des NMR-Spektrometers ist $\nu_R = 600,13\text{MHz}$. Die Maximalstärke des Gradientensystems mit drei orthogonalen Gradientenspulen ist 600mT/m . Mit Hilfe eines integrierten Heizungsreglers konnte die Temperatur über einen großen Bereich reguliert werden. Eine Stabilisierung der Temperatur nach einer Änderung im Bereich zwischen $\pm 10^\circ\text{C}$ war dabei nach einer dreiviertel Stunde gewährleistet. Zur Signalaufnahme, sowie für die RF-Einstrahlung wurde eine kombinierte Sende-/Empfangsspule mit einem Innendurchmesser von 5mm verwendet.



Abbildung 3.1: Das verwendete 14,1T-NMR-Spektrometer Avance II am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg.

Aufgrund der Optimierung der verwendeten Hochfrequenz-Spule zur Detektion von niedrigkonzentrierten organischen Verbindungen wurden bei Messungen von wässrigen Lösungen *radiation damping* Effekte (Kirsch und Hull, 2008) beobachtet. Diese wurden durch das ver-

gleichsowie sehr große Wassersignal hervorgerufen und hatten eine unvorhersehbare Abschwächung, sowie Verbreiterung aller Resonanzen im NMR-Spektrum zur Folge. Diese Effekte konnten jedoch durch eine Verstimmung der Resonanz des Sende-/Empfangsschwingkreises und eine damit einhergehende verschlechterte Güte der Hochfrequenz-Spule verhindert werden. Dadurch wurde die ungestörte Detektion des Wassersignals und somit die CEST-Spektroskopie an einem Ultrahochfeld-NMR-Spektrometer ermöglicht.

Für jede Modelllösung wurde das eingestrahlte RF-Feld separat kalibriert, indem die Pulsdauer $t_{p,360^\circ}$ eines 360° -Pulses bestimmt wurde. Mit Hilfe des verwendeten Leistungspegel PL_{360° des RF-Senders, der für die Kalibrierung des 360° -Pulses verwendet wurde, konnte somit ein gewünschtes B_1 präzise eingestellt werden:

$$PL(B_1) = 20 \cdot \log \left(\frac{1}{\frac{\gamma}{2\pi} \cdot t_{p,360^\circ} \cdot B_1} \right) + PL_{360^\circ} \quad (3.1)$$

3.1.2 Ganzkörper-MR-Tomograph

Der Ganzkörper-MR-Tomograph MAGNETOM 7T (Abbildung 3.2) mit einer Magnetfeldstärke von $B_0 = 6,98\text{ T}$ ist ein Produkt der Firma Siemens (Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland). Die experimentell ermittelte ^1H -Resonanzfrequenz des Ganzkörper-MR-Tomographen ist $\nu_R = 297,18\text{ MHz}$. Die Maximalstärke des Gradientensystems mit drei orthogonalen Gradientenspulen für die Ortskodierung in der Bildgebung ist 28 mT/m . Zur Signalaufnahme, sowie für die RF-Einstrahlung wurde eine kombinierte Sende-/Empfangsspule verwendet, die speziell für Kopfuntersuchungen von Menschen konstruiert wurde. Diese besteht aus einer Sendespule im *Birdcage*-Design und einer 24-Kanal-Empfangsspule. Zur Regulierung der Temperatur von Modelllösungen wurde eine MR-kompatible Thermosflasche verwendet, die mit $1,81$ Wasser befüllt wurde.



Abbildung 3.2: Der verwendete 7T-Ganzkörper-MR-Tomograph MAGNETOM 7T am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg. Die Abbildung wurde von www.dkfz.de entnommen.

3.2 Aufnahme von MR-Daten

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte zum Erfassen der MR-Daten in dieser Arbeit beschrieben. In diesem Kontext werden die verwendeten NMR-Pulssequenzen eingeführt und die jeweiligen Messparameter definiert. Die individuellen Einstellungen für eine Messreihe einer bestimmten Modelllösung sind in Abschnitt A.1 des Anhangs dokumentiert. Die Implementierung und Optimierung aller verwendeten Pulssequenzen am NMR-Spektrometer mittels der Software TopSpin (Bruker, Karlsruhe-Rheinstetten, Deutschland) wurden im Rahmen dieser Arbeit realisiert.

3.2.1 Z-Spektren

Normalisierte Z-Spektren wurden gemäß $Z(\Delta\omega) = M_{sat}(\Delta\omega)/M_0$ (Gleichung 2.35) berechnet, wobei M_{sat} dem Wassersignal nach einer Sättigung beim Frequenzoffset $\Delta\omega$ entspricht. Zur Normalisierung der Z-Spektren wurde ein voll relaxiertes Signal M_0 bei off-resonanter RF-Einstrahlung ($\Delta\omega = -350$ ppm) aufgenommen. Die Z-Spektren wurden mit N_{sample} Datenpunkten abgetastet. Die Verteilung der einzelnen Datenpunkte über den Aufnahmebereich $\pm\Delta\omega_{sample}$ wurde dabei dem Verlauf der Z-Spektren angepasst.

CEST-Spektroskopie

Die folgende Pulssequenz für CEST-Spektroskopie wurde am NMR-Spektrometer verwendet. Eine Sättigung beim Frequenzoffset $\Delta\omega$ wurde mittels eines cw RF-Rechteckpulses (engl. *rectangular*, *rect*) der Dauer t_{sat} und Amplitude B_1 realisiert (Abbildung 3.3). Residuale x-y-Magnetisierung nach der Sättigungsphase wurde mittels eines sog. *Spoiler*-Gradienten vollständig dephasiert. Ein kurzer 90° -rect-RF-Puls ermöglichte die anschließende Aufnahme eines NMR-Spektrums der Wasser-Magnetisierung. Eine Integration der Wasserresonanz im Bereich zwischen $\pm 0,5$ ppm führte zum Signal $M_{sat}(\Delta\omega)$.

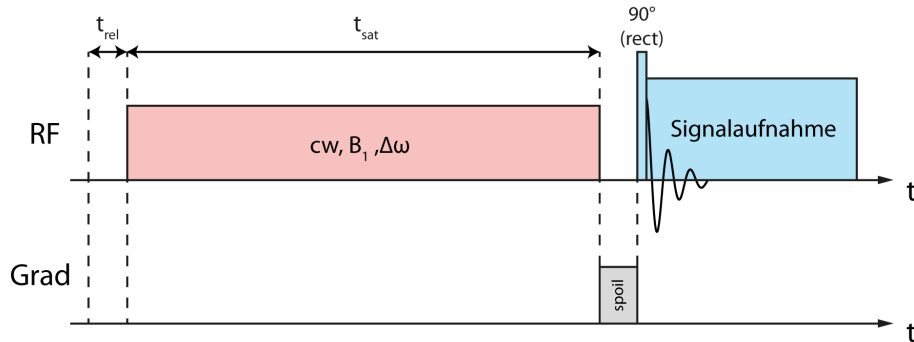


Abbildung 3.3: Pulssequenz der CEST-Spektroskopie. Die Sättigungsphase ist rot unterlegt, wohingegen die Auslese des modifizierten Wassersignals blau markiert ist.

CEST-Bildgebung

Aufgrund von RF-Limitationen am verwendeten Ganzkörper-MR-Tomographen konnte die Sättigung im Fall der CEST-Bildgebung nicht durch einen cw RF-Puls realisiert werden. Stattdes-

sen wurde ein Pulszug aus N_{pulse} Gauß-förmigen RF-Pulsen der Gesamtdauer t_{sat} verwendet (Abbildung 3.4). Die einzelnen RF-Pulse der Amplitude $B_{1,mean}$ (Gleichung 2.62) haben dabei eine Dauer t_p im ms-Bereich und sind durch Pausen der Länge t_d voneinander getrennt. Der Anteil der Pulsdauer im Vergleich zur Pause wird durch den *duty cycle* (DC, Gleichung 2.61) angegeben. Spoiler-Gradienten in den Pausen sorgen für eine vollständige Dephasierung residualer x-y-Magnetisierung nach jedem einzelnen Sättigungspuls. Für die anschließende Bildgebung des modifizierten Wassersignals $M_{sat}(\Delta\omega)$ wurde eine konventionelle *Gradient Echo* (GRE) NMR-Pulssequenz verwendet. Deren Aufnahmeschema wird durch die Anzahl der Wiederholungen (engl. *number of excitations*, nex), die Echozeit T_E , die Repetitionszeit T_R , das Bildfeld (engl. *field of view*, FOV), die Pixelmatrix, sowie durch die Auflösung bzw. Größe eines Pixels in mm^3 festgelegt. Abschließend wurden die aufgenommenen Z-Spektren linear interpoliert und B_0 -Inhomogenitäten mittels der WASSR-Methode (Kim u. a., 2009) korrigiert. Zusätzlich wurden B_1 -Inhomogenitäten durch Interpolation von CEST-Bildern bei verschiedenen Referenzspannungen ausgeglichen (Windschuh u. a., 2015c).

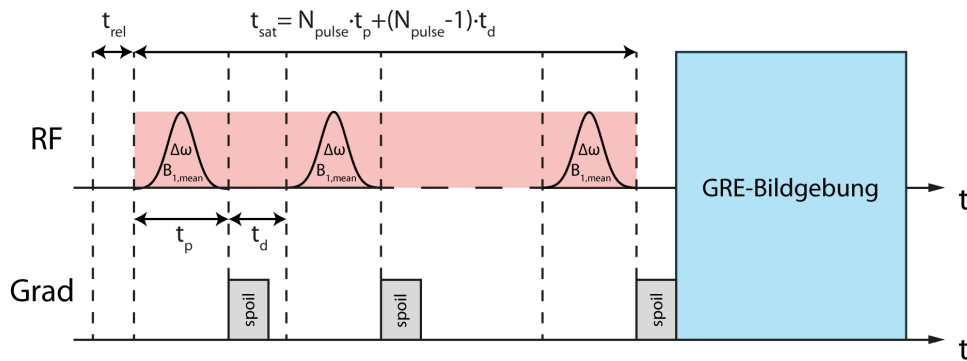


Abbildung 3.4: Pulssequenz der CEST-Bildgebung. Die Sättigungsphase ist rot unterlegt, wohingegen die Auslese des modifizierten Wassersignals blau markiert ist.

3.2.2 T_1 -Bestimmung

In Hinblick auf die AREX-Auswertung von Z-Spektren (Unterabschnitt 3.3.1) wurde zu jeder CEST-Messung die T_1 -Relaxationszeit der Wasserprotonen bestimmt.

T_1 -Bestimmung für die CEST-Spektroskopie

T_1 -gewichtete Spektren am NMR-Spektrometer wurden mittels einer *saturation-recovery* Pulssequenz aufgenommen. Diese verwendet einen cw-rect-RF-Puls der Dauer t_{sat} , um das Wassersignal zu sättigen, gefolgt von einem Intervall der Dauer T_I , das den Wasserprotonen die longitudinale Relaxation zurück in den Gleichgewichtszustand ermöglichte. Eine Integration der Wasserresonanz im Bereich zwischen $\pm 0,5 \text{ ppm}$ ergibt das Signal $M_z(T_I)$. Durch einen Fit von N_I Kontrasten bei verschiedenen T_I mittels $M_z(T_I) = M_0(1 - e^{-T_I/T_1})$ (Gleichung 2.24) konnte die Relaxationszeit T_1 des Wassersignals bestimmt werden.

T_1 -Bestimmung für die CEST-Bildgebung

T_1 -gewichtete MR-Bilder am Ganzkörper-MR-Tomographen wurden mittels einer *saturation-recovery* GRE Pulssequenz aufgenommen. Diese entspricht im Prinzip der NMR-Pulssequenz die auch zur T_1 -Bestimmung am NMR-Spektrometer verwendet wurde. Die GRE-Bildgebung (*nex*, T_E , T_R , FOV, Pixelmatrix, Auflösung) ermöglicht jedoch eine Berechnung der T_1 -Relaxationszeit in jedem einzelnen Voxel.

3.2.3 ^1H -NMR-Spektren

Mit der ^1H -NMR-Spektroskopie können Konzentrationsverhältnisse von chemischen Gruppen gelöster organischer Verbindungen bestimmt werden. ^1H -Spektren am NMR-Spektrometer wurden mittels einer 1D *nuclear Overhauser effect spectroscopy* (NOESY)-Pulssequenz aufgenommen. Zur besseren Auflösung schwacher Signale wurde das Wassersignal vor der Pulssequenz durch einen cw-rect-RF-Pulses der Dauer t_{sat} gesättigt. Dies hatte zudem eine Unterdrückung der *radiation damping* Effekte (siehe Unterabschnitt 3.1.1) zur Folge, wodurch die volle Sensitivität der Detektionsspule genutzt werden konnte. Um Einflüsse auf die NMR-Spektren durch NOE-Beiträge zu minimieren, wurde eine kurze Mischungszeit τ_M verwendet. Für ein erhöhtes Signal-Rausch-Verhältnis wurde die Sequenz *nex* mal wiederholt.

3.2.4 WEX-Spektren

Water Exchange (WEX)-Spektroskopie (Mori u. a., 1994, 1996a) ermöglicht, wie auch die CEST-Spektroskopie, die Detektion von Magnetisierungstransfereffekten zwischen Wasserprotonen und Protonen gelöster organischer Verbindungen. Hierbei handelt es sich um eine Art "umgekehrtes" CEST-Experiment. Während bei der CEST-Spektroskopie der Sättigungstransfer im vergleichsweise großen Wasser-Pool detektiert wird, misst die WEX-Spektroskopie den Magnetisierungstransfer in den seltenen Protonen-Pools. Die Magnetisierungstransfereffekte bauen sich dabei während der sog. Mischungszeit T_M auf. Die Dynamik der WEX-Signale als Funktion von T_M wird durch die Austauschrate k_{sw} des jeweiligen Magnetisierungstransfer-Prozesses charakterisiert. Die Stärke der WEX-Signale hingegen ist unabhängig von k_{sw} und direkt proportional zum Protonen-Verhältnis f_s der seltenen Pools. Somit ermöglicht die WEX-Spektroskopie Änderungen in k_{sw} von Variationen in f_s zu unterscheiden (Unterabschnitt 3.3.5). Aufgrund der Unterdrückung von WEX-Signalen schnell-austauschender Systeme, ist zudem eine selektive Detektion von Magnetisierungstransfer-Effekten mit vergleichsweise langsamen Raten unter $\approx 100\text{Hz}$ möglich.

Die WEX-Pulssequenz wurde, wie in (Goerke u. a., 2014; Goerke, 2012) beschrieben, am NMR-Spektrometer implementiert. Im Gegensatz zur Implementierung auf einem Ganzkörper-MR-Tomographen konnte jedoch auf eine Ortskodierung verzichtet werden. Wie auch bei der ^1H -Spektroskopie war es möglich, eine Verstimmung des Sende-/Empfangsschwingkreises zu umgehen, um die Sensitivität der Detektionsspule zu erhöhen (siehe Unterabschnitt 3.1.1). Dafür musste lediglich, wie von Mori et al. (Mori u. a., 1994, 1996a) vorgeschlagen, ein Spoiler-Gradient, während der kompletten Mischungszeit T_M hinzugefügt werden. Für ein genügendes Signal-Rausch-Verhältnis wurde die Sequenz *nex* mal wiederholt. Ein Intervall t_{rel} vor jedem Durchlauf ermöglichte die Relaxation der Wassermagnetisierung zurück in den Gleichgewichtszustand. Die Einstellung der WATERGATE-Technik beim Frequenzoffset $\pm\Delta\omega_{\text{WATERGATE}}$ ermöglichte eine Echozeit T_E im Bereich von einigen ms.

3.3 Auswertung von MR-Daten

In diesem Abschnitt werden die verschiedenen Methoden zur quantitativen Auswertung der aufgenommenen MR-Daten beschrieben. Die hier angewandten individuell angepassten Techniken für eine Messreihe einer bestimmten Modelllösung sind im Anhang A.1 dokumentiert. Die Programmierung aller Evaluierungsskripte mittels der Software Matlab (The MathWorks, Natick, MA, USA) wurde im Rahmen dieser Arbeit realisiert.

3.3.1 AREX-Spektren

Isolierte Sättigungstransfer-Effekte, die frei sind von Einflüssen der DS, des ssMT und der T_1 -Relaxation des Wassersignals, wurden mit Hilfe der AREX-Methode (Zaiss u. a., 2014) berechnet: $AREX = 1/T_1(1/Z_{lab} - 1/Z_{ref})$ (Gleichung 2.67). Z_{lab} entspricht hierbei den aufgenommenen Datenpunkten im Z-Spektrum. Das Referenzspektrum Z_{ref} beinhaltet alle Beiträge zum Z-Spektrum, ausgenommen der zu isolierenden CEST-Effekte. Da Z_{ref} nicht durch eine Messung alleine gewonnen werden kann, sind im Folgenden die in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Bestimmung eines geeigneten Referenzspektrums aufgelistet.

Lorentz-Fit

Für die Separation der Gesamtheit aller auftretenden CA- und rNOE-Signale im Z-Spektrum ist ein Referenzspektrum notwendig, das lediglich die Beiträge des ssMT und der DS enthält. Eine Möglichkeit, solch ein Referenzspektrum zu generieren, ist ausschließlich die Abschnitte im Z-Spektrum zu verwenden, die eindeutig dem ssMT und der DS zugeordnet werden können, um mittels eines Fits das übrige Z-Spektrum zu approximieren (Jones u. a., 2013). Hierbei handelt es sich um Z-Werte im Bereich sehr kleiner Frequenzoffsets ($\Delta\omega_{fit} \leq 0,5$ ppm) oder sehr großer Frequenzoffsets ($\Delta\omega_{fit} \geq 7$ ppm). Theoretisch kann das Z-Spektrum eines Multi-Pool-Systems durch mehrere Lorentz-förmige Funktionen (\mathcal{L}_i) angenähert werden (Gleichung 2.60). Eine Approximation des gesuchten Referenzspektrums ist somit mittels nachfolgender Gleichung möglich:

$$Z_{ref} = Z_{max} - (\mathcal{L}_{DS} + \mathcal{L}_{ssMT}) \quad (3.2)$$

Um gegebenenfalls eine nicht vollständige Relaxation des Wassersignals bei großen Frequenzoffsets zurück in den Gleichgewichtszustand zu kompensieren, wurde zusätzlich eine von Eins abweichende Amplitude des Z-Spektrums Z_{max} dem Fit-Modell hinzugefügt. Somit konnte die Gesamtheit aller CA- und rNOE-Signale mit Hilfe des Referenzspektrums Z_{ref} berechnet werden (Abbildung 3.5). Für die Separation sehr kleiner CEST-Effekte ($AREX < 0,1\%$) war eine weitere Korrektur der Grundlinie ($Z \approx 1$) in den Z-Spektren notwendig. Aufgrund von Relaxations-Effekten zeigte diese bei genauer Betrachtung eine geringe Neigung, welche durch eine lineare Funktion mit der Steigung m korrigiert werden konnte:

$$Z_{ref} = \underbrace{m \cdot \Delta\omega}_{\text{lineare Fkt.}} + Z_{max} - (\mathcal{L}_{DS} + \mathcal{L}_{ssMT}) \quad (3.3)$$

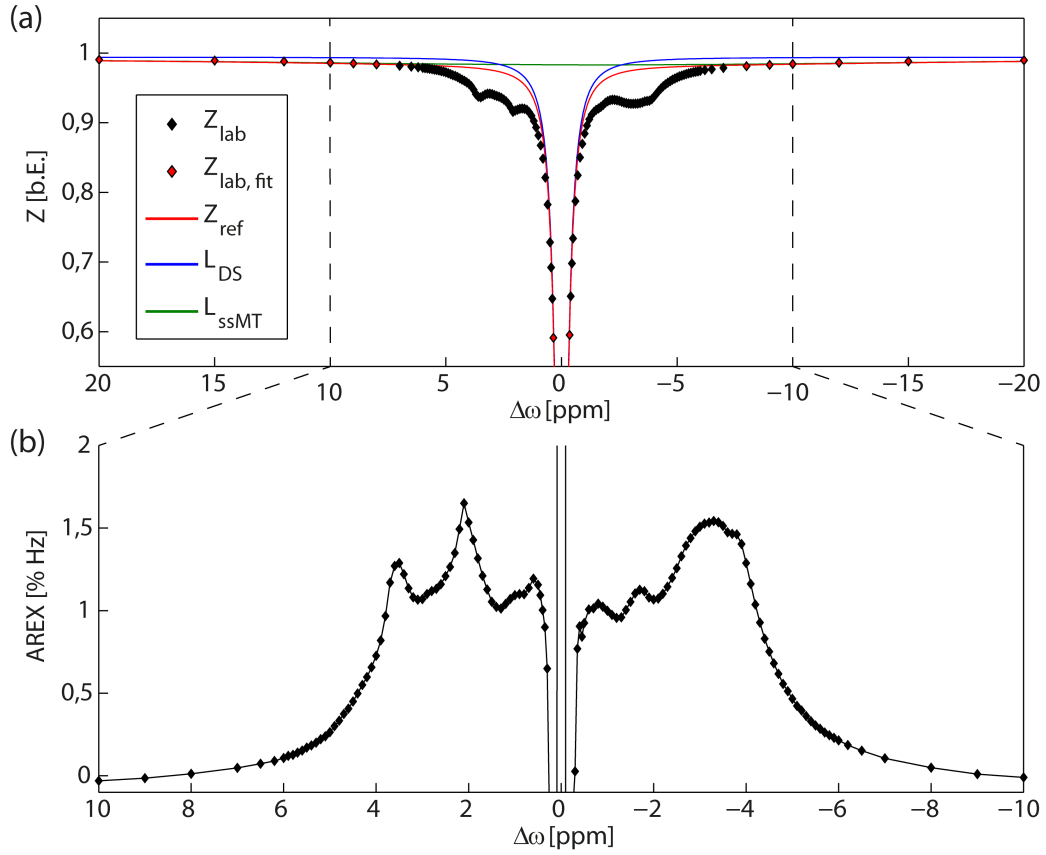


Abbildung 3.5: AREX-Auswertung eines exemplarischen Z-Spektrums bei $B_0 = 14,1$ T. (a) Für den Fit des Referenzspektrums Z_{ref} (rote Linie) mittels Gleichung 3.2 wurden lediglich die Datenpunkte $Z_{lab,fit}$ (rote Diamanten) verwendet. Diese liegen ausschließlich in Bereichen des Z-Spektrums, in denen keine Effekte durch CA oder rNOE auftreten. Die einzelnen Beiträge der DS (blaue Linie) und des ssMT (grüne Linie) wurden durch Lorentz-förmige Funktionen approximiert. (b) Isolierte CA- und rNOE-Signale berechnet anhand des quantitativen Parameters AREX (Gleichung 2.67).

Drei-Punkt-Methode (TPM)

Die Separation eines spezifischen CA-Effekts vom Untergrund anderer Beiträge in einem AREX-Spektrum ist mit Hilfe der sog. Drei-Punkt-Methode (engl. *three point method*, TPM) (Jin u. a., 2013) möglich. Dabei wird die Additivität der einzelnen Beiträge zum AREX-Signal genutzt (Gleichung 2.68):

$$AREX_{TPM} = AREX - AREX_{TPM,Ref} \quad (3.4)$$

Das Referenzspektrum $AREX_{TPM,Ref}$, das die übrigen Beiträge enthält, wird bei dieser Methode

durch eine Gerade mit der Steigung m und dem Achsenabschnitt c angenähert (Abbildung 3.6):

$$AREX_{TPM,Ref}(\Delta\omega) = \underbrace{\frac{AREX(\omega_2) - AREX(\omega_1)}{\omega_2 - \omega_1}}_{=m} \cdot \Delta\omega + \underbrace{AREX(\omega_2) - m \cdot \omega_2}_{=c} \quad (3.5)$$

Ein Hinweis für die Funktionalität der TPM ist ein Lorentz-förmiger Verlauf des isolierten CA-Effekts $AREX_{TPM}$.

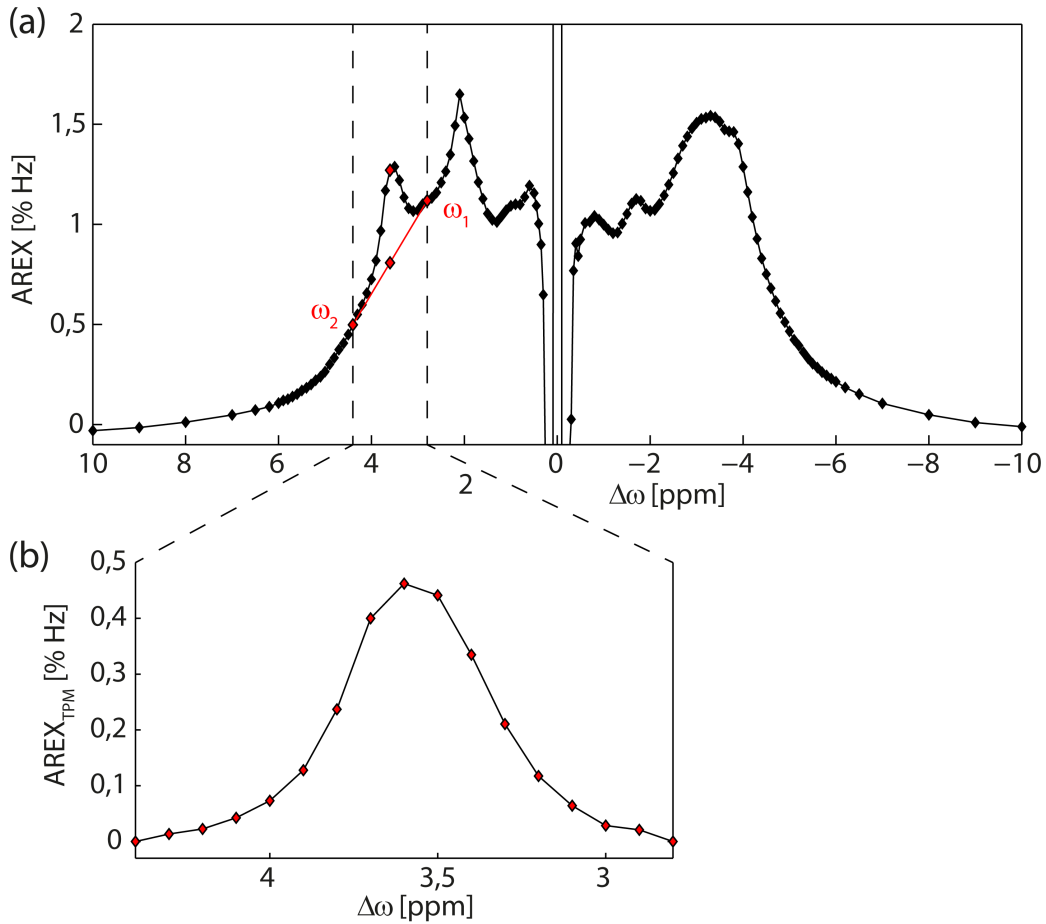


Abbildung 3.6: (a) Weist ein AREX-Spektrum (schwarze Diamanten) eine selektive CA-Resonanz über einer Grundlinie (rote Linie) anderer Effekte auf, so kann dieser Beitrag vom restlichen AREX-Signal mittels der Drei-Punkt-Methode separiert werden. (b) Isolierter CA-Effekt $AREX_{TPM}$.

Multi-Lorentz-Fit

Für die Auswertung der am Ganzkörper-MR-Tomographen aufgenommenen Z-Spektren, wurde ein sog. Multi-Lorentz-Fit (Desmond u. a., 2013) verwendet. Jeder markante Beitrag zum Z-Spektrum wurde dabei durch eine einzelne Lorentz-förmige Funktion ($\mathcal{L}_{type,i}$) an der Stelle

$\Delta\omega_{\mathcal{L}_{max,type,i}}$ repräsentiert (Gleichung 2.60):

$$Z_{lab} = Z_{max} - \left(\mathcal{L}_{DS} + \mathcal{L}_{ssMT} + \sum_i \mathcal{L}_{CA,i} + \sum_j \mathcal{L}_{rNOE,j} \right) \quad (3.6)$$

In Analogie zum Paragraph Lorentz-Fit wurde ebenfalls eine von Eins abweichende Amplitude des Z-Spektrums Z_{max} dem Fit-Modell hinzugefügt. Dies ermöglichte die Kompensation einer unter Umständen nicht vollständigen Relaxation des Wassersignals bei großen Frequenzoffsets zurück in den Gleichgewichtszustand. Mittels eines geeigneten Referenzspektrums, das alle Beiträge zum Z-Spektrum ausgenommen des zu separierenden CEST-Effekts enthält, lässt sich jeweils ein AREX-Spektrum für jeden einzelnen Beitrag berechnen. Für einen exemplarischen Beitrag $R_{CA,sep}$ gilt somit (Abbildung 3.7):

$$Z_{ref} = Z_{max} - \left(\mathcal{L}_{DS} + \mathcal{L}_{ssMT} + \sum_{i \neq sep} \mathcal{L}_{CA,i} + \sum_j \mathcal{L}_{rNOE,j} \right) \quad (3.7)$$

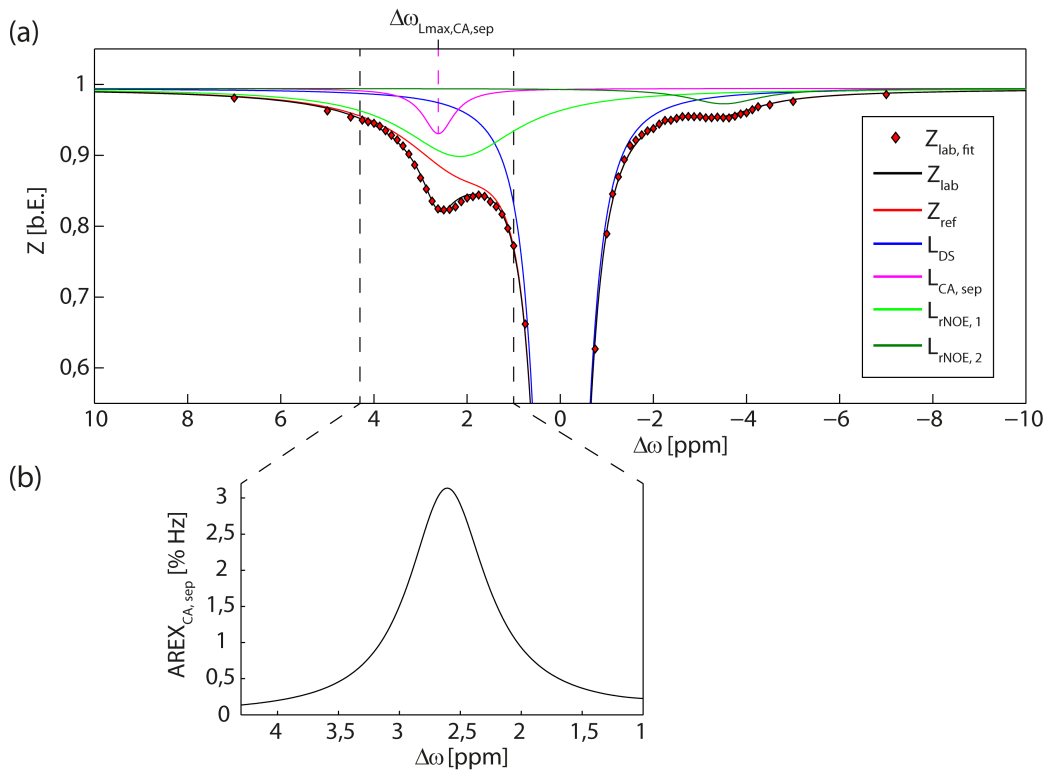


Abbildung 3.7: AREX-Auswertung eines exemplarischen CEST-Effekts $R_{CA,sep}$ (masurta Linie) bei $B_0 = 7$ T. (a) Für den Multi-Lorentz-Fit des Z-Spektrums Z_{lab} (schwarze Linie) mittels Gleichung 3.6 wurden alle Datenpunkte $Z_{lab,fit}$ (rote Diamanten) verwendet. Das Referenzspektrum Z_{ref} (rote Linie, Gleichung 3.7) für die AREX-Auswertung setzt sich aus der DS (blaue Linie), sowie den restlichen CEST-Effekten (hell- und dunkelgrüne Linie) zusammen. (b) Isolierter CA-Effekt $R_{CA,sep}$ berechnet anhand des quantitativen Parameters AREX (Gleichung 2.67).

Für die Darstellung des MR-Kontrasts $AREX_{type,i}(\Delta\omega_{\mathcal{L}_{max,type,i}})$ eines spezifischen CEST-Effekts beim Frequenzoffset $\Delta\omega_{\mathcal{L}_{max,type,i}}$ wurde dessen AREX-Spektrum $AREX_{type,i}$ im Intervall $\Delta\omega_{int}$ gemittelt.

3.3.2 AREX-Denaturierungskurven

Denaturierungskurven beschreiben die relative Änderung eines bestimmten Signals mit fortschreitender Entfaltung oder Aggregation eines Modellsystems. Hierfür wurden AREX-Spektren bei einem spezifischen Frequenzoffset $\Delta\omega$ mittels:

$$\Delta AREX(\Delta\omega) = \frac{AREX(\Delta\omega) - AREX_{Ref}(\Delta\omega)}{AREX_{Ref}(\Delta\omega)} \quad (3.8)$$

ausgewertet und als Funktion des Parameters aufgetragen, der die jeweilige Denaturierung bewirkt hatte (Detergens-Konzentration, Temperatur des Hitzeschocks, etc.). $AREX_{Ref}(\Delta\omega)$ entspricht dabei dem Referenzwert bei nativer Faltungskonfiguration.

3.3.3 Quantitative Bestimmung von k_{sw} und f_s

In diesem Unterabschnitt wird eine Methode zur simultanen Bestimmung der Austauschrate k_{sw} und des Protonen-Verhältnisses f_s eines Pool s von Protonen beschrieben (Zaiss und Bachert, 2013a; Goerke u. a., 2015a; Meissner u. a., 2015). Dabei wurde die sogenannte Ω -Plot-Methode von (Dixon u. a., 2010) mit der AREX-Auswertung (Unterabschnitt 2.3.4) kombiniert. Liegt ein isolierter CEST-Effekt vor, der durch eine in Unterabschnitt 3.3.1 beschriebenen Methode vom Z-Spektrum separiert wurde, so gilt für dessen Amplitude im LS-Limit ($\delta\omega_s \gg \omega_1$):

$$AREX = R_{ex,LS}^{on} = f_s k_{sw} \frac{(\gamma B_1)^2}{\underbrace{(\gamma B_1)^2 + k_{sw}(k_{sw} + R_{2s})}_{=\alpha(B_1)}} \quad (3.9)$$

Im Fall einer großen Austauschrate ($k_{sw} \gg R_{2s}$) ist $1/AREX$ eine lineare Funktion von $1/B_1^2$ mit der Steigung m und dem Achsenabschnitt c :

$$\frac{1}{AREX} = \underbrace{\frac{k_{sw}}{\gamma^2 f_s}}_{=m} \frac{1}{B_1^2} + \underbrace{\frac{1}{f_s k_{sw}}}_{=c} \quad (3.10)$$

Die Aufnahme mehrerer AREX-Spektren mit verschiedenen Sättigungsamplituden B_1 ermöglicht somit die simultane Bestimmung von k_{sw} und f_s mittels linearer Regression:

$$k_{sw} = \sqrt{\frac{m}{c}} \quad (3.11)$$

$$f_s = \frac{1}{\sqrt{mc}} \quad (3.12)$$

3.3.4 afAREX-Signal

Das *aromatic-rNOE-free* AREX (afAREX)-Signal ist eine Methode zur Separation des AREX-Signals von Amid-Protonen (Windschuh u. a., 2015a,b). Diese resonieren bei einem Frequenzoffset von $\Delta\omega \approx 3,5$ ppm. Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde (siehe Ergebnisteil, Kapitel 4), treten jedoch bei dieser Frequenz in Z-Spektren von lebenden Organismen auch rNOE-Signale von aromatischen Protonen auf. Unter Annahme eines konstanten Verhältnisses r_{rNOE} von rNOE-Signalen aromatischer und aliphatischer Protonen:

$$r_{rNOE} = \frac{AREX_{rNOE,aromatisch}}{AREX_{rNOE,aliphatisch}} \quad (3.13)$$

ist es somit möglich, den Anteil dieser rNOE-Signale von aromatischen Protonen vom AREX-Gesamt signal bei $\Delta\omega = 3,5$ ppm abzuschätzen. Das separierte Amid-Protonen-Signal ergibt sich folglich zu:

$$afAREX_{CA,Amid} = AREX(3,5 \text{ ppm}) - r_{rNOE} \cdot AREX_{rNOE,aliphatisch} \quad (3.14)$$

3.3.5 WEX-Signal

Eine Integration der aufgenommenen WEX-Spektren (Unterabschnitt 3.2.4) bei diversen Mischungszeiten T_M im Bereich $[\Delta\omega_1; \Delta\omega_2]$ ergibt das Signal $S_{WEX}(T_M)$. Für ein 2-Pool-System gilt für das WEX-Signal als Funktion von T_M (Zhou u. a., 2004; Goerke u. a., 2014):

$$S_{WEX}(T_M) \sim f_s \cdot (e^{-R_{1w} \cdot T_M} - e^{-k_{sw} \cdot T_M}) \quad (3.15)$$

wobei $k_{sw} \gg k_{ws}$ und $k_{sw} \gg (R_{1s} - R_{1w})$ erfüllt sein muss. Durch Fit des WEX-Signals können somit Änderungen in der Austauschrate k_{sw} von einem veränderten Protonen-Verhältnis f_s unterschieden werden (Abbildung 3.8). Für rNOE-Effekte entspricht k_{sw} der effektiven Magnetisierungstransfer-Rate von einem Pool fest gebundener Protonen zum Wasser-Pool.

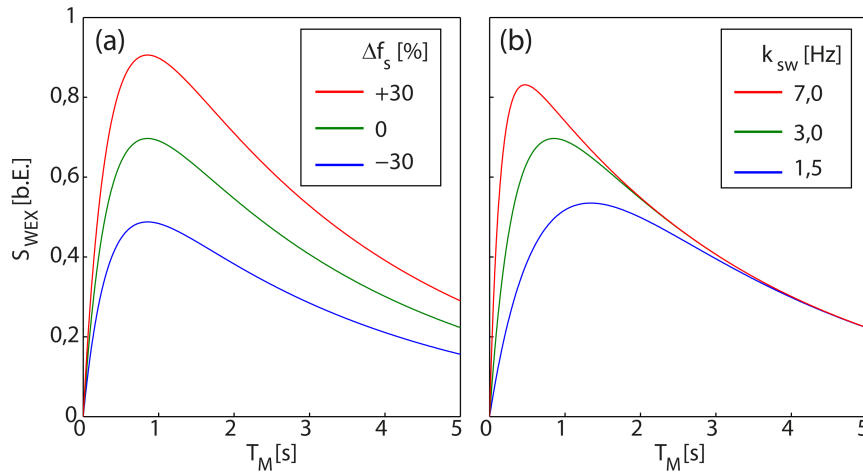


Abbildung 3.8: WEX-Signal S_{WEX} als Funktion der Mischungszeit T_M (a) bei verschiedenen f_s und $k_{sw} = 3$ Hz, sowie bei (b) verschiedenen k_{sw} und einem konstanten f_s . Für die Abbildung wurde $R_{1w} = 0,3$ Hz angenommen. Folglich kann eine höhere Austauschrate k_{sw} durch einen steileren Signalanstieg identifiziert werden.

3.4 Fluoreszenz-Spektroskopie

Fluoreszenz (FL)-Spektroskopie stellt eine etablierte Methode in der Biochemie zur Detektion der Faltungszustände von Proteinen dar. Dabei dominiert die fluoreszierende Eigenschaft der Aminosäure Tryptophan die Fluoreszenz der restlichen aromatischen Aminosäuren. Zur Detektion von Fluoreszenz-Spektren wurde in dieser Arbeit ein Tecan Infinite 200 PRO plate reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) verwendet. Dieser nutzt Ultraviolettstrahlung der Wellenlänge $\lambda = 295\text{ nm}$ für die Anregung der Tryptophan-Einheiten. Eine Integration der emittierten Fluoreszenz-Spektren im Bereich $\Delta\lambda_{\text{int}} \approx 300 - 400\text{ nm}$ ergibt das Signal FL. FL-Denaturierungskurven ΔFL wurden in Analogie zur Methode in Unterabschnitt 3.3.2 berechnet.

3.4.1 Pearson-Korrelationsanalyse

Zur Überprüfung eines linearen Zusammenhangs zwischen dem FL-Signal und einer spezifischen AREX-Denaturierungskurve wurde der Korrelationskoeffizient von Pearson (engl. *Pearson product-moment correlation coefficient*, *PCC*) mittels des Programms SigmaPlot (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) berechnet. Im Fall einer abweichenden Abtastung der FL- und AREX-Denaturierungskurven als Funktion des Denaturierungsparameters wurde das FL-Signal interpoliert und auf die Abtastung der AREX-Signale angepasst. Der Parameter *PCC* kann Werte zwischen ± 1 annehmen, wobei $+1$ einem vollständig positiven und -1 einem vollständig negativen linearen Zusammenhang entspricht. Bei $PCC = 0$ besteht keinerlei lineare Korrelation. Die Aussage des berechneten *PCC* ist statistisch signifikant, falls der p-Wert unter der weitverbreiteten Schwelle von 0,01 liegt. Die Pearson Korrelationsanalyse ist jedoch unabhängig von der Amplitude der zu untersuchenden Signaländerungen. Um auch die Stärke der relativen Signaländerungen zu berücksichtigen, wurden die AREX-Denaturierungskurven als Funktion der FL-Denaturierungskurven linear gefittet. Vergleichbare Signaländerungen der AREX- und FL-Denaturierungskurven konnten somit durch eine Steigung $m = \pm 1$ identifiziert werden.

3.5 Modellsysteme

Im Folgenden sind alle in dieser Arbeit verwendeten Modellsysteme aufgelistet. Hierbei handelt es sich um wässrige Lösungen spezifischer Proteine und um heterogen zusammengesetzte Gemische von Proteinen. Für Messungen einer Modelllösung am NMR-Spektrometer bzw. Ganzkörper-MR-Tomographen wurden Volumina von 1 bzw. 30 ml verwendet. Für die Fluoreszenz-Spektroskopie war ein Volumen von 0,1 ml pro Modelllösung ausreichend. Der pH-Wert aller Modelllösungen wurde mit Hilfe Phosphat-gepufferter Salzlösungen (PBS) reguliert. In der Regel bestanden die PBS-Lösungen aus $c = (1/15)$ M Natrium-Kalium-Phosphat. Aufgrund einer möglichen Komplexbildung des Kalium-Ions mit Detergenzien wurden für einige Experimente jedoch ausschließlich Salze von Natrium-Phosphat verwendet. Die individuellen Parameter einer bestimmten Modelllösung (Konzentrationen aller Inhaltsstoffe, pH-Wert, Puffer, etc.) sind in Abschnitt A.1 des Anhangs dokumentiert.

Zur Herstellung von Modelllösungen wurden hochkonzentrierte Lösungen der jeweiligen Inhaltsstoffe, sog. Stocklösungen, verwendet. Das benötigte Volumen $V_{stock,i}$ einer Stocklösung mit der Konzentration $c_{stock,i}$, um eine Endkonzentration $c_{end,i}$ bei einem Gesamtvolumen aller Inhaltsstoffe von $V_{ges} = \sum_i V_{stock,i}$ zu erhalten, berechnet sich gemäß:

$$V_{stock,i} = \frac{c_{end,i}}{c_{stock,i}} V_{ges} \quad (3.16)$$

Für die Darstellung einer Stoffmengenkonzentration $[c] = \text{mol/l}$ als Massenkonzentration $[c_m] = \text{‰(w/v)}$, welche den prozentualen Gewichtsanteil vom Gesamtvolumen angibt, kann folgende Umrechnung verwendet werden:

$$c_m = \frac{1}{10} \cdot c \cdot M \quad (3.17)$$

mit der molaren Masse $[M] = \text{g/mol} = \text{Da}$.

3.5.1 Bovine Serum Albumin (BSA)

Bovine Serum Albumin (BSA) ist ein Protein, das aus dem Blutplasma von Rindern gewonnen wird. Hierbei handelt es sich um ein kommerziell erhältliches Protein, welches oft als Konzentrationsstandard in der Biologie verwendet wird. BSA setzt sich aus insgesamt 583 Aminosäuren zusammen und besitzt eine molare Masse von 66,46 kDa. Eine genaue Auflistung der Zusammensetzung der Aminosäuren in BSA ist in Tabelle A.3 angegeben.

Zur Herstellung von BSA-Modelllösungen wurde eine Stocklösung mit einem Proteingehalt von 13,4 % (w/v) verwendet. Dies ermöglichte, unter Zugabe von Detergenzien, Pufferlösungen, etc., eine Endkonzentration von 2,5 % (w/v). Zur Änderung der T_1 -Relaxationszeit des Wassers wurde der Gadolinium-Komplex Gadopentetat-Dimeglumin (Gd-DTPA, Magnevist MRI Kontrastmittel; Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) mit einer Stock-Konzentration von $c_{stock,Gd-DTPA} = 0,5 \text{ M}$ verwendet.

Entfaltung

Die Entfaltung von BSA wurde durch Zugabe von Natriumlaurylsulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) initiiert. Dabei handelt es sich um ein Tensid, welches aus einem hydrophilen

Kopf und einer hydrophoben Restkette aufgebaut ist. SDS findet Anwendung als Detergens in Reinigungsmitteln. Mischung mit BSA führt zu einer Entfaltung des Proteins (Abbildung 3.9). Bei der Herstellung von Modelllösungen wurde mit einer Stocklösung von $c_{stock,SDS} = 200\text{ mM}$ gearbeitet.

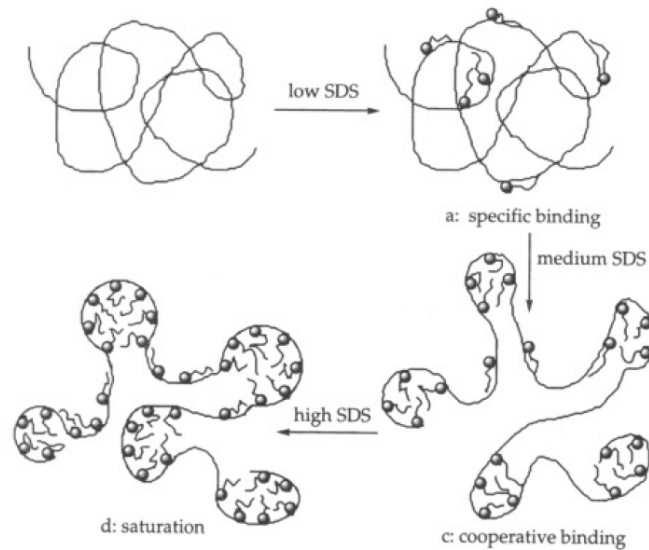


Abbildung 3.9: Die Entfaltung von BSA (dargestellt als durchgezogene Linie) mittels SDS (dargestellt als hydrophiler Kopf mit einer hydrophoben Restkette) kann in drei Phasen gegliedert werden. (a) Anbindung: SDS-Moleküle binden selektiv an bestimmte Bereiche des BSA. (c) Entfaltung: Ab einer bestimmten Anzahl an SDS-Molekülen kommt es zur Entfaltung von BSA. Dabei werden Mizellen ausgebildet, die statistisch zufällig entlang der Polypeptidkette des BSA verteilt sind. Diese BSA-SDS-Komplexe sind als Perlenketten-Modell (engl. *pearl necklace model*) bekannt (Guo u. a., 1990; Turro u. a., 1995). (d) Sättigung: Die Zugabe von mehr SDS führt nicht zu einer weiteren Entfaltung von BSA. Die Abbildung wurde aus (Turro u. a., 1995) übernommen.

3.5.2 Huntingtin (HTT)-Protein

Die verwendeten Modelllösungen mit extrahierten Huntingtin (HTT)-Proteinen wurden von der Arbeitsgruppe für Proteomforschung und molekulare Mechanismen bei neurodegenerativen Erkrankungen, unter der Leitung von Prof. Dr. Erich Wanker, am Max-Delbrück-Center für Molekulare Medizin in Berlin, zur Verfügung gestellt. Das HTT-Protein zeichnet sich durch eine abnorm lange Abfolge der Aminosäure Glutamine (Q) in der Aminosäuresequenz aus. Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte HTT-Protein, mit einer molaren Masse von 13,41 kDa, enthielt dabei einen Abschnitt mit 49 aufeinanderfolgenden Glutamine-Aminosäureresten (Tabelle A.4). Bei einer Gesamtanzahl von 116 Aminosäuren entspricht dieser Abschnitt $\approx 40\%$ des Proteins. Die Akkumulation verschiedener HTT-Proteine im menschlichen Gehirn ist für die Krankheit Chorea Huntington verantwortlich. Bei der Akkumulation kommt es zu einem Aggregationsprozess, der im Rahmen dieser Arbeit mittels CEST-Spektroskopie untersucht wurde.

Aggregation

Die Aggregation der HTT-Proteine wurde durch Anbindung der Glutathion-S-Transferase (GST) verhindert. GST ist ein Enzym mit 244 Aminosäuren und einer molaren Masse von 28,43 kDa (Tabelle A.5). Durch Abtrennung des GST von den HTT-Proteinen konnte eine kontrollierte Aggregation der Proteine herbeigeführt werden. Die Abspaltung der GST erfolgte mittels der sog. PreScission Protease (PSP). Hierbei handelt es sich um ein Enzym, das eine Aminosäurekette lediglich bei der Abfolge –LEVLFQGP– von Aminosäureresten selektiv zerteilt. Die Trennung erfolgte dabei an der Stelle –LEVLFQ↔GP–, wodurch 18 Aminosäurereste mit einer molaren Masse von insgesamt 2,00 kDa an den HTT-Proteinen hängenblieben. Nach Zugabe der PSP wurde 24 h gewartet, um eine Aggregation der HTT-Proteine herbeizuführen. Zur Kontrolle wurde außerdem eine Lösung gemessen, die keine Proteine, jedoch alle zur Extraktion und Konservierung verwendeten Substanzen enthielt.

3.5.3 β -Amyloid ($A\beta$)

Extrahierte β -Amyloide ($A\beta$) wurden ebenfalls von der Arbeitsgruppe für Proteomforschung und molekulare Mechanismen bei neurodegenerativen Erkrankungen am Max-Delbrück-Center in Berlin zur Verfügung gestellt. Die Bezeichnung $A\beta$ umfasst zwei Peptide, die sich durch ihre Länge von 40 bzw. 42 Aminosäureresten unterscheiden lassen. Für die Experimente in dieser Arbeit wurde jedoch ausschließlich das $A\beta_{42}$ mit einer molaren Masse von 4,51 kDa verwendet (Tabelle A.6). Die Akkumulation von $A\beta$ im extrazellulären Bereich des menschlichen Gehirns ist ein potentieller Auslöser der Alzheimer-Krankheit. Bei der Akkumulation kommt es einem Aggregationsprozess, der im Rahmen dieser Arbeit mittels CEST-Spektroskopie untersucht wurde.

Aggregation

Zur Herstellung der $A\beta_{42}$ -Modelllösungen wurde eine Stocklösung mit $c_{stock, A\beta_{42}} = 500 \mu\text{M}$ verwendet. Eine Aggregation der β -Amyloide konnte dabei unter Verwendung von Natronlauge (NaOH, $c_{NaOH} = 10 \text{ mM}$) als Lösungsmittel unterbunden werden. Zur Initiierung der Aggregation wurde der pH-Wert mit Hilfe einer Puffer-Stocklösung in den Bereich physiologischer Werte erniedrigt. Eine Erhöhung der Temperatur auf 37°C begünstigte ebenfalls den Aggregationsprozess. Eine Sättigung der Aggregation konnte somit innerhalb von 24 h erreicht werden.

3.5.4 Hefezellen-Lysat

Die Hefezellen für die Herstellung der Lysate in dieser Arbeit (Zelllinie: Wildtyp BY4741) wurden von der Arbeitsgruppe für Biogenese und Qualitätskontrolle von Proteinen, unter der Leitung von Prof. Dr. Bernd Bukau, am Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg (ZMBH) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden über Nacht in einem *yeast extract peptone dextrose* (YPD) Nährmedium kultiviert. Um eventuelle Signale des Nährmediums in den aufgenommenen Z-Spektren zu vermeiden, wurden die Zellen zweimal mit PBS bei $pH = 7$ gewaschen. Die Aufreinigung der Zellen gelang durch das Zentrifugieren bei einer relativen Zentrifugalbeschleunigung (RZB) von 1000 g für 5 min.

Hefezellen

Hefen sind eukaryotische Zellen und erhalten daher alle charakteristischen Organellen (Zellkern, Mitochondrien, etc.) einer menschlichen Zelle. Für Messungen intakter Hefezellen wurde der extrazelluläre pH-Wert durch Zugabe von 40 μ l PBS pro Gramm Zellen stabilisiert. Der intrazelluläre pH-Wert intakter Hefezellen liegt bei $pH \approx 6,6$ (Salhany u. a., 1975).

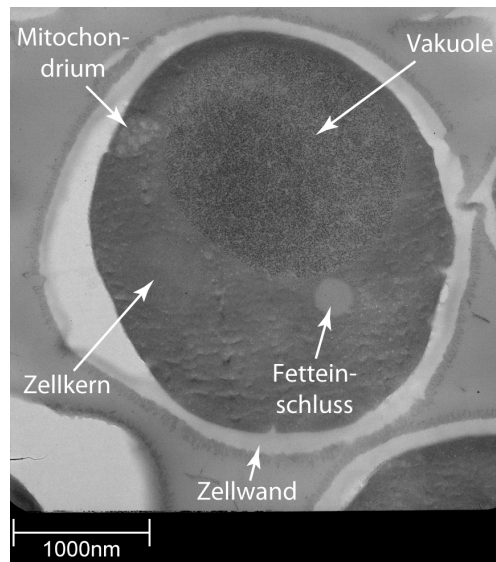


Abbildung 3.10: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer intakten Hefezelle. Das intrazelluläre Kompartiment (dunkelgrauer Bereich) wird durch die Zellwand (weißer Bereich) von der Umgebung getrennt. Im Vergleich zu anderen eukaryotischen Zellen besitzen Hefezellen eine außergewöhnlich robuste und voluminöse Zellwand. Innerhalb der Zelle sind diverse Organellen und Strukturen (weiße Pfeile) erkennbar. Das EM-Bild wurde im Rahmen dieser Arbeit von der Abteilung für Elektronenmikroskopie unter der Leitung von Dr.Karsten Richter am DKFZ in Heidelberg aufgenommen.

Lyse-Vorgang

Für die Herstellung der Lysate in dieser Arbeit wurde die sog. Glaskügelchen-Methode verwendet. Im Gegensatz zu anderen Lyse-Verfahren mittels z.B. Detergenzien oder hohem Druck, profitiert diese mechanische Methode von einer lediglich schwachen Modifikation des Proteoms. Die Zellwände werden dabei durch Scherkräfte von kleinen Glaskügelchen aufgeschlagen. Zellorganellen hingegen bleiben weitgehend unbeschädigt. Durch eine zusätzliche Zentrifugation können die löslichen Proteine aus dem Zellinneren extrahiert werden. Der speziell für die Glaskügelchen-Methode angefertigte BeadBeater (BioSpec Products Inc., Bartelsville, OK, USA) (Abbildung 3.11 (a)) ermöglichte einen Zellwandbruch mit einer Effizienz von $\approx 90\%$. Durch die Scherkräfte der Glaskügelchen kann es zu einer enormen Hitzeentwicklung innerhalb der Lyse-Kammer (Abbildung 3.11 (b)) kommen. Diese hätte eine Denaturierung des Proteoms zur Folge. Eine kritische Erwärmung des Lysates konnte jedoch durch eine sequenzielle Ausführung des Lyse-Vorgangs, sowie einer Lagerung der Kammer in einem Eiswasserbad verhin-

dert werden. Für die Lyse wurden, wie vom Hersteller empfohlen, Glaskügelchen mit einem Durchmesser von $d = 0,5\text{ mm}$ verwendet.

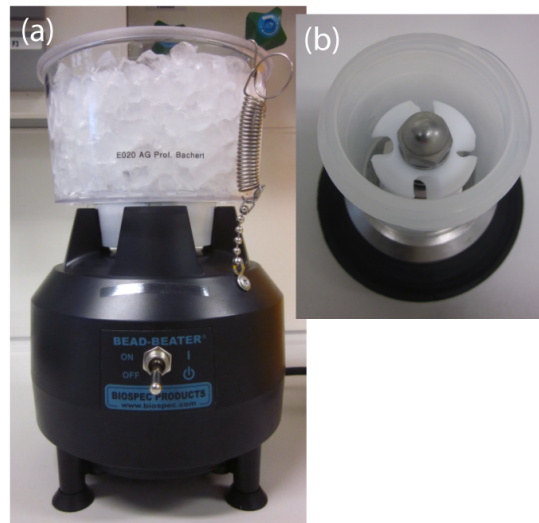


Abbildung 3.11: (a) Der verwendete BeadBeater zur Herstellung von Hefezellen-Lysaten. Zur Kühlung der Lyse-Kammer während des Betriebs wurde diese in einem Eiswasserbad aufbewahrt. (b) Verwendete Lyse-Kammer mit einem Fassungsvermögen von 15 ml. Im Inneren der Kammer ist der Rotor zum beschleunigen der Glaskügelchen angebracht.

Das in dieser Arbeit zur Herstellung von Hefezellen-Lysaten verwendete Protokoll wurde in Zusammenarbeit mit Katharina Milde (Milde, 2015) optimiert und basiert auf (Michal Jazwinski, 1990; BioSpec, 2015).

(i) Zell-Suspension:

Hefezellen wurden, wie zuvor erläutert, gewaschen und in PBS suspendiert. Der Anteil an Hefezellen vom Gesamtgewicht der Suspension betrug dabei

$$R_{cells} = m_{cells} / (m_{cells} + m_{PBS}) = 0,3.$$

(ii) Befüllung der Lyse-Kammer:

Im ersten Schritt wurden die Glaskügelchen mit einem Durchmesser von $d = 0,5\text{ mm}$ in die Kammer gegeben, bis der Rotor komplett bedeckt war ($V_{beads} \approx 13\text{ ml}$). Im zweiten Schritt wurde die Kammer vollständig mit der Zell-Suspension befüllt ($V_{susp} \approx 20\text{ ml}$). Alle Bestandteile wurden zuvor auf 4°C gekühlt.

(iii) Lyse-Vorgang:

Die befüllte Kammer wurde innerhalb eines Eiswasserbades auf dem BeadBeater (Abbildung 3.11) positioniert. Der Lyse-Vorgang wurde in 12 Einzeldurchläufe untergliedert, die jeweils aus einem Lyse-Intervall von 10s und einer anschließenden Kühlpause von 60s bestanden. Dies entspricht einer Betriebszeit des BeadBeater von insgesamt 2 min. Aufgrund der sequenziellen Ausführung konnte die Zell-Suspension konstant unter einer Temperatur von 28°C gehalten werden. Abschließend wurde die lysierte Suspension auf $T = 4^\circ\text{C}$ gekühlt.

3 Material und Methoden

(iv) Extraktion der Glaskügelchen:

Die Glaskügelchen wurden mittels einer eigens angefertigten Konstruktion in einem Zentrifugen-Röhrchen gesammelt (detaillierte Beschreibung in Abbildung 3.12). Die Zentrifuge wurde dabei mit $RZB = 1000\text{ g}$ für 1 min bei $T = 4^\circ\text{C}$ betrieben.

(v) Trennung einzelner Kompartimente:

Durch Zentrifugation der lysierten Suspension bei $RZB = 15000\text{ g}$ für 1 h bei $T = 4^\circ\text{C}$ wurden die einzelnen Bestandteile in verschiedene Schichten getrennt. Die flüssige Phase, welche alle löslichen Bestandteile der Zellen enthält, wird dabei als Lysat bezeichnet. Die viskosen bzw. festen Schichten aus Organellen und Fragmenten der Zellwände wurden mit Hilfe eines Spatels getrennt und separat in PBS suspendiert.

Das Lysat wurde bis kurz vor der Messung kontinuierlich bei $T = 4^\circ\text{C}$ gelagert. Dies verhinderte den fortschreitenden Abbau von Proteinen durch enzymatische Reaktionen von Proteasen (Proteolyse), welcher durch hohe Temperaturen begünstigt wird. Der pH-Wert des Lysates lag bei $pH \approx 6,8$. Durch Zugabe geringer Mengen (einige μl) Natronlauge (NaOH , $c_{\text{NaOH}} = 1\text{ M}$) konnte der pH-Wert in einem Bereich von $pH = 6,8 - 7,6$ eingestellt werden.



Abbildung 3.12: Zur Extraktion der Glaskügelchen aus der lysierten Suspension wurde diese in ein kleines Zentrifugen-Röhrchen gegeben. Aufgrund eines sehr feinen Loches am Boden des Röhrchens konnte die lysierte Zell-Suspension separat in einem Auffangbehälter gesammelt werden. Durch Zentrifugation der gesamten Konstruktion konnte der Vorgang enorm beschleunigt werden.

Denaturierung

Eine Denaturierung des Lysates wurde durch Zugabe von SDS, sowie durch einen Hitzeschock initiiert:

- Zugabe von SDS:

Für die Herstellung von SDS-Lysat-Lösungen wurde eine Stocklösung der Konzentration $c_{\text{stock,SDS}} = 600\text{ mM}$ verwendet. Durch Zugabe von SDS wurde somit das Lysat lediglich um einen Faktor 0,8 verdünnt. Dabei konnte eine maximale SDS-Konzentration von 120 mM erreicht werden.

- Hitzeschock:

Um Konzentrationsänderungen zu vermeiden wurde das Lysat während des Hitzeschocks in einem luftdichten NMR-Röhrchen aufbewahrt. Durch Befestigung des Röhrchens in einem Wasserbad konnte ein Hitzeschock beliebiger Dauer und Temperatur realisiert werden.

Konzentrationsanpassung

Aufgrund von Konzentrationsänderungen durch Zentrifugation, Zugabe von Detergenzien, etc. muss für einen quantitativen Vergleich der AREX-Spektren (Unterabschnitt 3.3.1) untereinander eine Konzentrationsanpassung vorgenommen werden. Diese Anpassung wurde unter Annahme gleicher Dichte aller Inhaltsstoffe vorgenommen: $\rho_{Zellen} \approx \rho_{Wasser} = 1 \text{ g/ml}$. Aufgrund des hohen Wassergehalts von lebenden Organismen ist diese Annahme gerechtfertigt.

Durch das oben beschriebene Lyse-Verfahren konnten mehrere Kompartimente i der Masse $m_{comp,i}$ separiert werden. Dies entspricht einem Gewichtsanteil von:

$$R_{comp,i} = \frac{m_{comp,i}}{m_{all}} \quad (3.18)$$

wobei $m_{all} = \sum_i m_{comp,i}$ die Gesamtmasse aller Kompartimente ist. In einem weiteren Schritt wurde nun lediglich ein gewisser Anteil eines Kompartiments $m_{used,i}$ verwendet, um eine individuelle Modelllösung mit einem spezifischen pH-Wert oder einer gewissen Denaturierung herzustellen. Im Allgemeinen führte die Zugabe weiterer Lösungen m_{sol} zu einer Verdünnung mit dem Faktor:

$$R_{dil,i} = \frac{m_{used,i} + m_{sol}}{m_{used,i}} \quad (3.19)$$

Folglich müssen für einen quantitativen Vergleich der AREX-Spektren die aufgenommenen Daten $AREX_{acq}$ individuell korrigiert werden:

$$\begin{aligned} AREX &= R_{comp,i} \cdot R_{dil,i} \cdot AREX_{acq} \\ &= \frac{m_{comp,i} \cdot (m_{used,i} + m_{sol})}{m_{all} \cdot m_{used,i}} \cdot AREX_{acq} \end{aligned} \quad (3.20)$$

Für einen Vergleich der aufgenommenen AREX-Spektren von Lysaten mit den Spektren intakter Hefezellen ist zusätzlich eine Korrektur des Massenanteils der Hefezellen in der Zellsuspension R_{cells} notwendig.

3.5.5 Tierhirn-Homogenisat

Tierhirne wurden von der Abteilung für Kleintierbildgebung, unter der Leitung von Dr. Manfred Jugold, am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg zur Verfügung gestellt. Insgesamt zwei verschiedene Arten von Tierhirnen wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet: Mäuse- und Schweinehirn. Die Mäuse wurden dabei im Rahmen einer anderen Studie am DKFZ gezüchtet. Die Schweinehirne wurden unter kontinuierlicher Kühlung frisch von einem Schlachthof bezogen. Ein Homogenisat von Tiergewebe zeichnet sich durch zerbrochene Zellwände, jedoch intakte Organellen aus. Somit ist durch Zugabe einer Pufferlösung eine Kontrolle des pH-Wertes möglich. Der Zellaufschluss erfolgte mittels eines Dounce-Homogenisators

(Abbildung 3.13) bei einer Gewebekonzentration von $R_{tissue} = m_{tissue} / (m_{tissue} + m_{PBS}) = 2/3$. Dabei wurde zuerst ein Pistill mit einer Spaltbreite von $87,5 - 137,5 \mu\text{m}$ verwendet, um das Hirngewebe zu zerkleinern und anschließend eine Spaltbreite von $25 - 75 \mu\text{m}$, um einen vollständigen Zellaufschluss zu erreichen. Alle benötigten Geräte und Substanzen wurden zuvor auf eine Temperatur von 4°C gekühlt. Das Homogenisat wurde bis kurz vor der Messung auf Eis gelagert, um die Proteolyse zu hemmen.

Mäusehirn

Für das Homogenisat von Mäusehirnen wurden alle Areale der seziierten Gehirne verwendet. Da Mäusehirne größtenteils aus grauer Hirnsubstanz bestehen, können die Beiträge anderer Komponenten vernachlässigt werden. Aufgrund des geringen Volumens eines Mäusehirns waren zur Herstellung einer Modelllösung etwa drei Gehirne notwendig.

Schweinehirn

Das größere Volumen von Schweinehirnen und der größere Anteil an weißer Gehirnmasse ermöglichte die Herstellung eines Homogenisats, welches lediglich aus weißer Hirnsubstanz bestand. Dabei war ein Gehirn pro Modelllösung ausreichend.



Abbildung 3.13: Der verwendete Dounce-Homogenisator für den Zellaufschluss von Tiergewebe. Hierbei handelt es sich um ein gläsernes Pistill, das präzise an ein eng umfassendes Gefäß eingepasst wurde. Der sehr feine Spalt, durch den die Zellsuspension beim Homogenisieren gedrückt wird, hat eine Breite von einigen $10 \mu\text{m}$. Durch den Druck beim Hineindrücken des Pistills kommt es zu Scherkräften, die die Zellwände zerstören. Kleinere Zellorganellen, wie der Zellkern oder Mitochondrien, werden durch diese Methode nicht zerstört.

4 Ergebnisse

Zur Untersuchung des Einflusses von Denaturierung auf die CEST-Effekte von Proteinen wurden in einem ersten Schritt einzelne spezifische Protein-Isoformen untersucht. Somit konnten CEST-Signaländerungen unter Protein-Entfaltung, als auch während der Aggregation von Proteinen separat analysiert werden. Für die Untersuchung der Entfaltung wurde BSA verwendet (Abschnitt 4.1), wohingegen die Aggregation mittels spezifischer Monomere detektiert werden konnte (Abschnitt 4.2). In Annäherung an das komplexe Zusammenspiel von Proteinen in einem lebenden Organismus wurde in einem zweiten Schritt die Denaturierung von einem heterogen zusammengesetzten Gemisch von Proteinen untersucht. Hierfür wurde das Lysat von Hefezellen benutzt (Abschnitt 4.3). Die Anwendung der gewonnenen Erkenntnisse führte zur Entwicklung eines MR-Kontrasts, welcher sehr sensitiv auf CEST-Signaländerungen reagiert, die durch die Denaturierung von Proteinen hervorgerufen werden (Abschnitt 4.4).

4.1 Entfaltung von BSA

Im Folgenden wird der Einfluss der Entfaltung auf die CEST-Effekte von BSA untersucht (Unterabschnitt 4.1.2). Eine Entfaltung von BSA wurde durch Zugabe des Detergens SDS induziert. Dabei konnten charakteristische Signaländerungen detektiert werden, die in einer Signatur der Protein-Entfaltung zusammengefasst wurden (Goerke u. a., 2015a). Mittels einer quantitativen Analyse der CEST-Signaländerungen konnte darüber hinaus die Auswirkung der Entfaltung auf den ^1H -Magnetisierungstransfer zwischen Proteinen und freiem Wasser auf einer molekularen Ebene verstanden werden (Unterabschnitt 4.1.3).

4.1.1 Isolierte Sättigungstransfer-Effekte

Im Vorfeld der Denaturierungsexperimente wurde die Berechnung isolierter Sättigungstransfer-Effekte mittels der AREX-Methode (Unterabschnitt 3.3.1) für rNOE-Signale überprüft. In den Z-Spektren von BSA sind rNOE-Signale aliphatischer Protonen im Bereich negativer Frequenzoffsets detektierbar (Abbildung 4.1 (a)). Im Bereich positiver Frequenzoffsets überlagern rNOE-Signale von aromatischen Protonen mit CA-Effekten von an Stickstoff gebundenen Protonen (Abbildung 2.11). Wie theoretisch erwartet (Gleichung 2.59), weisen diese Signale im Z-Spektrum eine starke Abhängigkeit von der T_1 -Relaxationszeit des Wassers auf (Abbildung 4.1 (a)). Durch Berechnung der AREX-Spektren konnte jedoch, wie erwartet, eine Korrektur des Einflusses einer veränderten T_1 -Relaxation erreicht werden (Abbildung 4.1 (b)). Eine Übereinstimmung der AREX-Spektren war über den gesamten Bereich selektiver CEST-Signale zu beobachten. Somit ist die Berechnung isolierter Sättigungstransfer-Effekte, die frei sind von Einflüssen der DS, des ssMT und der T_1 -Relaxation des Wassersignals, mittels der AREX-Auswertung nicht nur für CA-Effekte, sondern auch für rNOE-Signale möglich.

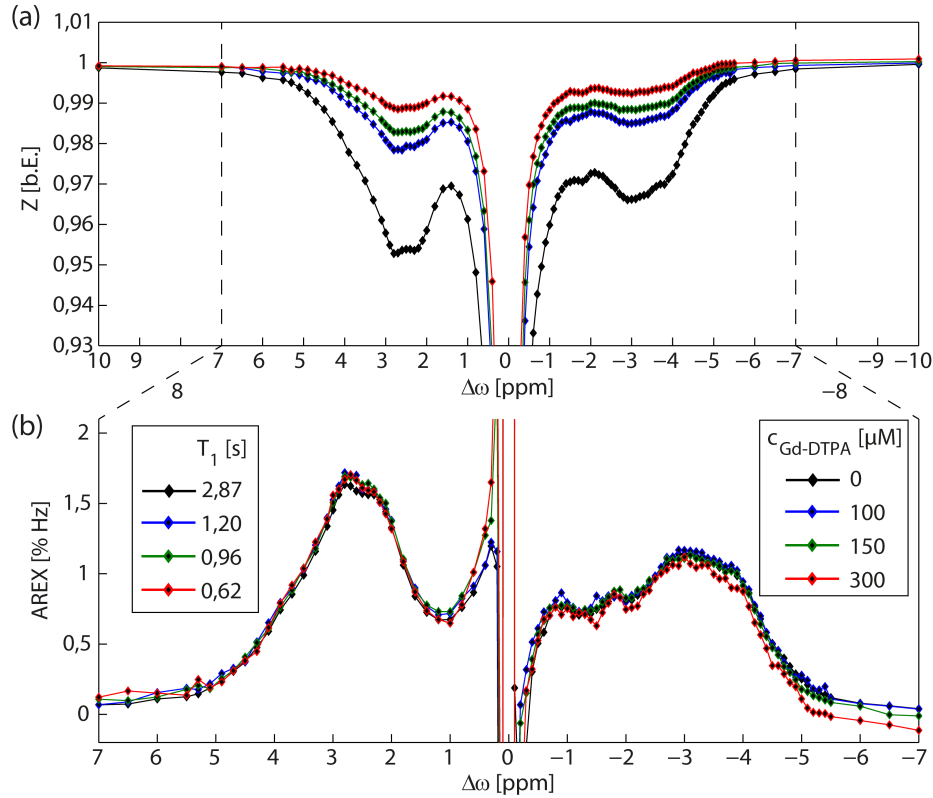


Abbildung 4.1: (a) Z-Spektren ($B_1 = 0,75 \mu\text{T}$, $t_{\text{sat}} = 15 \text{ s}$) von BSA ($pH = 7$, $T = 25^\circ\text{C}$) zeigen eine starke Abhängigkeit der CEST-Effekte von der T_1 -Relaxation des Wasser-signals. Änderungen von T_1 wurden durch Zugabe des Gadolinium-Komplexes Gd-DTPA induziert. (b) Die AREX-Auswertung ermöglicht die Berechnung isolierter Sättigungstransfer-Effekte (CA- und rNOE-Signale), die frei sind von Einflüssen der T_1 -Relaxation.

4.1.2 CEST-Signaländerungen unter Entfaltung

Durch die Entfaltung von BSA ist eine Abnahme der Sättigungstransfer-Effekte, die mit den Frequenzoffsets von aliphatischen und aromatischen Protonen übereinstimmen, zu beobachten (Abbildung 4.2 (a)). Die spektrale Position, sowie die relative Häufigkeit dieser fest gebundenen Protonen ist in den ^1H -Spektren zu erkennen (Abbildung 4.2 (b)). Bei fortschreiten der Entfaltung ist außerdem eine verbesserte Selektivität der ^1H -Signale beobachtbar, welche auf eine Abnahme der Dispersion der chemischen Verschiebung zurückzuführen ist. Betrachtet man jedoch die AREX-Spektren im Bereich von $\Delta\omega = 2,7 \text{ ppm}$, so ist hingegen ein Anstieg der Sättigungstransfer-Effekte zu erkennen (Abbildung 4.2 (a)). Dieser Bereich entspricht dem Frequenzoffset chemisch austauschender Amin-Protonen, welche mittels konventioneller ^1H -Spektroskopie nicht detektierbar sind (Abbildung 4.5). Die Identifizierung aller auftretenden CA- und rNOE-Signale in den AREX-Spektren von BSA wird in Abbildung 4.5 und 4.6 gezeigt. Die T_1 -Relaxationszeit des Wassersignals lag unabhängig vom Faltungszustand von BSA bei $(2,83 \pm 0,03) \text{ s}$. Außerdem konnten keinerlei störende Sättigungstransfer-Effekte des Deter-

gens SDS beobachtet werden.

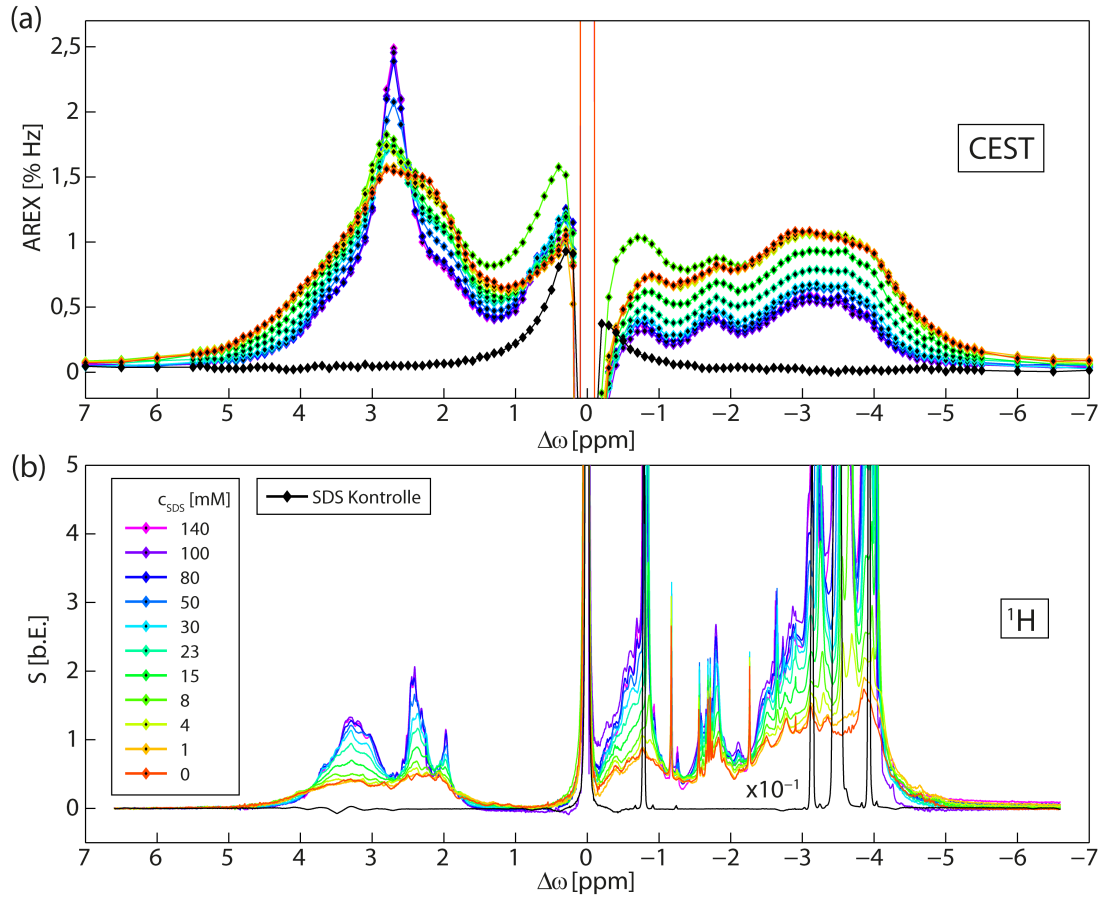


Abbildung 4.2: (a) AREX-Spektren ($B_1 = 0,75 \mu\text{T}$, $t_{\text{sat}} = 12 \text{ s}$) und (b) ^1H -Spektren von BSA bei $\text{pH} = 7$ und $T = 25^\circ\text{C}$. Die Spektren bei einer Konzentration von 0 bzw. 140 mM des Detergens SDS entsprechen nativem (orange Linie) bzw. entfaltetem (violette Linie) BSA. Um mögliche Störsignale des Detergens zu identifizieren, ist eine Lösung mit 100 mM SDS dargestellt. Im ^1H -Spektrum treten Signale der aliphatischen Protonen in SDS bei $-0,8$, $-3,1$, $-3,5$ und $-3,9 \text{ ppm}$ auf. Im AREX-Spektrum hingegen sind keine Sättigungstransfer-Effekte von SDS detektierbar. Die Abbildung wurde veröffentlicht in (Goerke u. a., 2015a).

Um den jeweiligen Faltungszustand von BSA bei einer gegebenen Konzentration an SDS zu bestimmen, wurde zusätzlich das Fluoreszenz (FL)-Signal (Abschnitt 3.4) aufgenommen. Aufgrund desselben sigmoidalen Verlaufs der AREX- und FL-Denaturierungskurven kann somit auf eine eindeutige Korrelation der Sättigungstransfer-Effekte mit der Proteinstruktur (nativ \leftrightarrow entfaltet) geschlossen werden (Abbildung 4.3). Die Detektion eines Plateaus der Denaturierungskurven ab einer SDS-Konzentration von $\approx 80 \text{ mM}$ weist darauf hin, dass der komplette Entfaltungsvorgang beobachtet werden konnte. Somit werden für die vollständige Entfaltung von BSA ca. 214 SDS-Moleküle pro Protein benötigt (berechnet anhand: $c_{\text{SDS}}/c_{\text{BSA}} = 80 \text{ mM}/373 \mu\text{M}$).

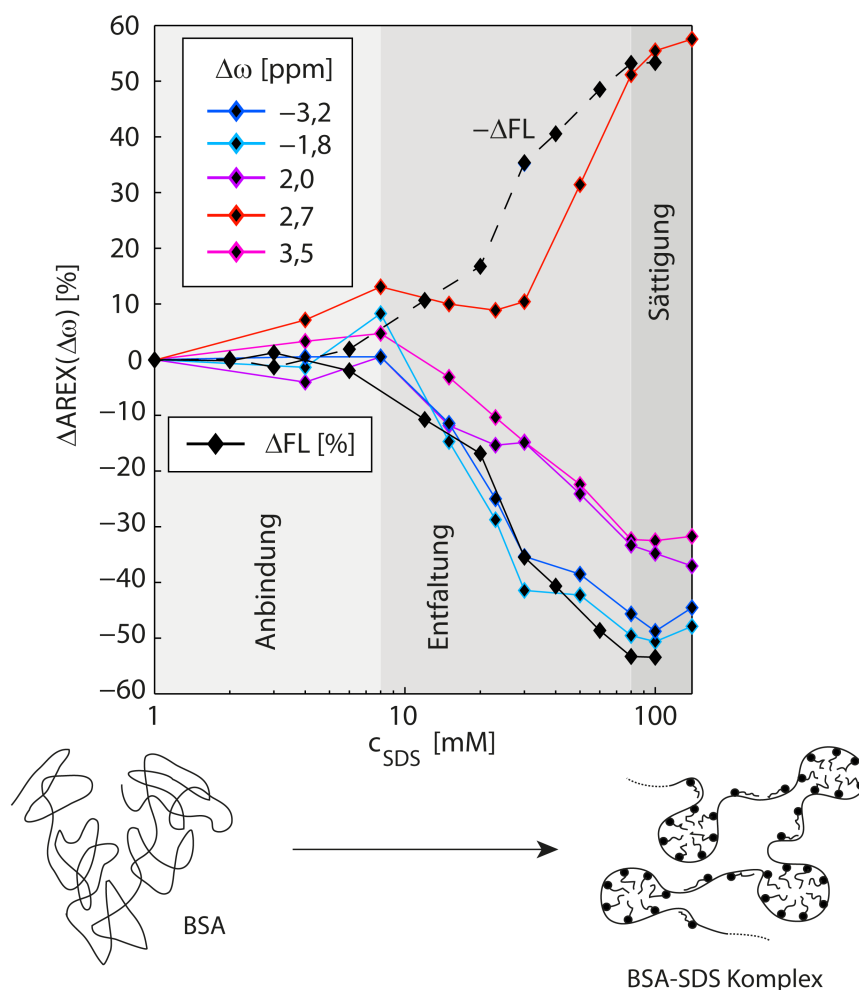


Abbildung 4.3: AREX-Denaturierungskurven bei verschiedenen Frequenzoffsets $\Delta\omega$ als Funktion der Detergens-Konzentration c_{SDS} . Die Denaturierungskurven wurden mittels der AREX-Spektren in Abbildung 4.2 berechnet. Als Referenz wurde zusätzlich eine Fluoreszenz (FL)-Denaturierungskurve (schwarze Linie) aufgenommen. Zum Vergleich ist die FL-Denaturierungskurve nochmals mit negativem Vorzeichen dargestellt (gestrichelte schwarze Linie). Anhand der Denaturierungskurven kann der Entfaltungsvorgang in drei verschiedene Phasen untergliedert werden (graue Flächen, siehe Abbildung 3.9). Die Illustration im unteren Teil der Abbildung skizziert die Entfaltung von BSA unter Ausbildung von BSA-SDS-Komplexen (Perlenketten-Modell, siehe Abbildung 3.9). Die Abbildung wurde veröffentlicht in (Goerke u. a., 2015a).

Korrelation von AREX- und FL-Denaturierungskurven

Um herauszufinden, bei welchen Frequenzoffsets $\Delta\omega$ sich die AREX-Denaturierungskurven am Besten eignen, um eine Aussage über die vorherrschende Proteinstruktur zu treffen, wurde eine Pearson-Korrelationsanalyse mit dem FL-Signal durchgeführt (siehe Unterabschnitt 3.4.1).

Dabei wurde ein positiver linearer Zusammenhang mit einem Pearson-Korrelationskoeffizienten $PCC \approx 1$ im gesamten Frequenzbereich aliphatischer und aromatischer Protonen beobachtet (Abbildung 4.4 (a)). Ebenso wurde eine lineare, jedoch negative Korrelation mit $PCC \approx -1$ bei $\Delta\omega = 2,7$ ppm detektiert. Das negative Vorzeichen deutet dabei auf die Gegenläufigkeit eines verstärkten Sättigungstransfer-Effekts, bei einem zugleich abnehmenden FL-Signal unter Protein-Entfaltung hin. Somit ist die Information über den Faltungszustand der Proteine in allen Sättigungstransfer-Effekten bei jedem Frequenzoffset im AREX-Spektrum enthalten.

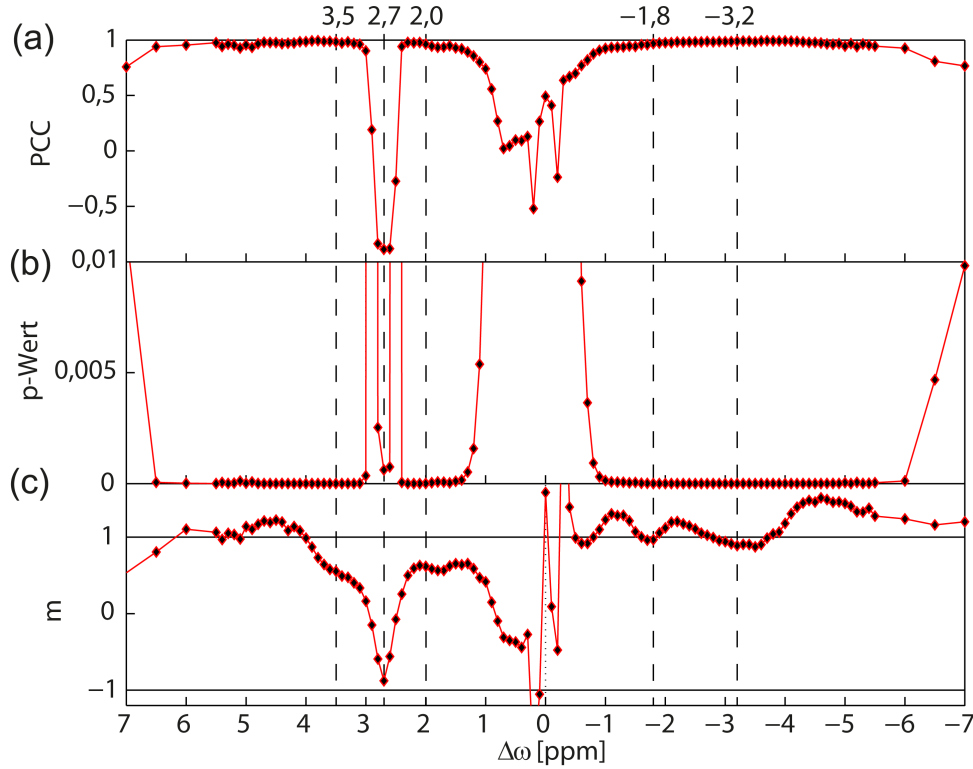


Abbildung 4.4: Pearson-Korrelationsanalyse zwischen dem FL-Signal und den AREX-Denaturierungskurven bei verschiedenen Frequenzoffsets $\Delta\omega$ (siehe Unterabschnitt 3.4.1). (a) Ein Pearson-Korrelationskoeffizienten PCC von $+1$ bzw. -1 entspricht einem vollständig positiven bzw. negativen linearen Zusammenhang. (b) p-Werte in den interessanten Frequenzbereichen, bei denen $PCC \approx \pm 1$ gilt, sind immer unter dem Schwellenwert von 0,01. Somit sind die Aussagen der im Fließtext genannten PCC statistisch signifikant. (c) Vergleichbare Amplituden der AREX- und FL-Denaturierungskurven können durch eine Steigung des Korrelationsplots mit $m = \pm 1$ identifiziert werden. Die gestrichelten Linien markieren die Frequenzoffsets der AREX-Denaturierungskurven in Abbildung 4.3. Die Abbildung wurde veröffentlicht in (Goerke u. a., 2015a).

Berücksichtigt man allerdings zusätzlich die Stärke der relativen Signaländerungen, so ist eine Differenzierung der einzelnen AREX-Denaturierungskurven bei verschiedenen Frequenzoffsets hinsichtlich der Übereinstimmung mit dem FL-Signal möglich. Dabei zeichnet sich der

Frequenzbereich um $\Delta\omega = -3,2$ ppm durch eine gute Übereinstimmung der AREX- und FL-Denaturierungskurven aus (Abbildung 4.3 und 4.4 (c)). Signale in diesem Bereich können vorwiegend auf Protonen in den Methylen-Gruppen ($-\text{CH}_2-$) diverser Aminosäurereste zurückgeführt werden (Abbildung 2.16). Eine ähnlich gute Übereinstimmung mit dem FL-Signal unter Berücksichtigung der Korrelation, sowie auch der Amplitude ist ebenfalls für AREX-Denaturierungskurven bei $\Delta\omega = -1,8$ und $2,7$ ppm detektierbar (Abbildung 4.3). Somit gibt es eine markante Änderung von Sättigungstransfer-Effekten bei verschiedenen Frequenzoffsets, welche prinzipiell in einer charakteristischen Signatur der Protein-Entfaltung zusammengefasst werden können. Die Abweichung der Amplituden der AREX-Denaturierungskurven bei $\Delta\omega = 2,0$ und $3,5$ ppm vom FL-Signal ist ein Hinweis auf sich überlappende, gegenläufige Signaländerungen unter Protein-Entfaltung. Daher wird im Folgenden die Zuordnung von rNOE- und CA-Signalen zu bestimmten Frequenzoffsets im AREX-Spektrum untersucht.

Identifizierung von CA- und rNOE-Signalen von Proteinen

Im Gegensatz zu rNOE-Signalen (Unterabschnitt 2.2.3), hängen CA-Effekte (Unterabschnitt 2.2.1) maßgeblich von der Kinetik der zugrundeliegenden Säure-Base-Reaktion ab. Folglich können stark variierende Sättigungstransfer-Effekte bei Änderung des pH oder der Temperatur auf einen chemischen Austausch zurückgeführt werden. In BSA wurden somit insgesamt drei individuelle CA-Effekte bei $\Delta\omega = 2,0$, $2,7$ und $3,5$ ppm identifiziert (Abbildung 4.5). Eine klare spektrale Separation der einzelnen Resonanzen konnte durch die Entfaltung von BSA erreicht werden. Grund hierfür ist die abnehmende Dispersion der chemischen Verschiebung unter Protein-Entfaltung. Mit Hilfe der Auflistung der ^1H -MR-Signale von Proteinen in Unterabschnitt 2.4.3 war eine Zuordnung der identifizierten CA-Signale zu Protonen aus drei verschiedenen chemischen Gruppen möglich:

- (i) Guanidinium-Protonen ($(\text{NH}_2)_2^+$) bei $\Delta\omega = 2,0$ ppm
- (ii) Amin-Protonen (NH_2) bei $\Delta\omega = 2,7$ ppm
- (iii) Amid-Protonen (NH) bei $\Delta\omega = 3,5$ ppm

Im negativen Frequenzbereich der AREX-Spektren ($\Delta\omega < 0$ ppm) sind rNOE-Signale von aliphatischen Protonen detektierbar (Abbildung 2.11). Änderungen der rNOE-Signale unter Variation des pH oder der Temperatur waren vernachlässigbar klein im Vergleich zur Signalabschwächung durch Protein-Entfaltung (Abbildung 4.5). Bei Betrachtung der AREX-Spektren im positiven Frequenzbereich ($\Delta\omega > 0$ ppm) ist unter Protein-Entfaltung, neben der Verstärkung der selektiven CA-Signale, ebenfalls eine überlappende breitbandige Signalabschwächung detektierbar (Abbildung 4.2). Dieser Signalabfall unter Protein-Entfaltung kann durch rNOE-Signale von aromatischen Protonen erklärt werden (Jin und Kim, 2013).

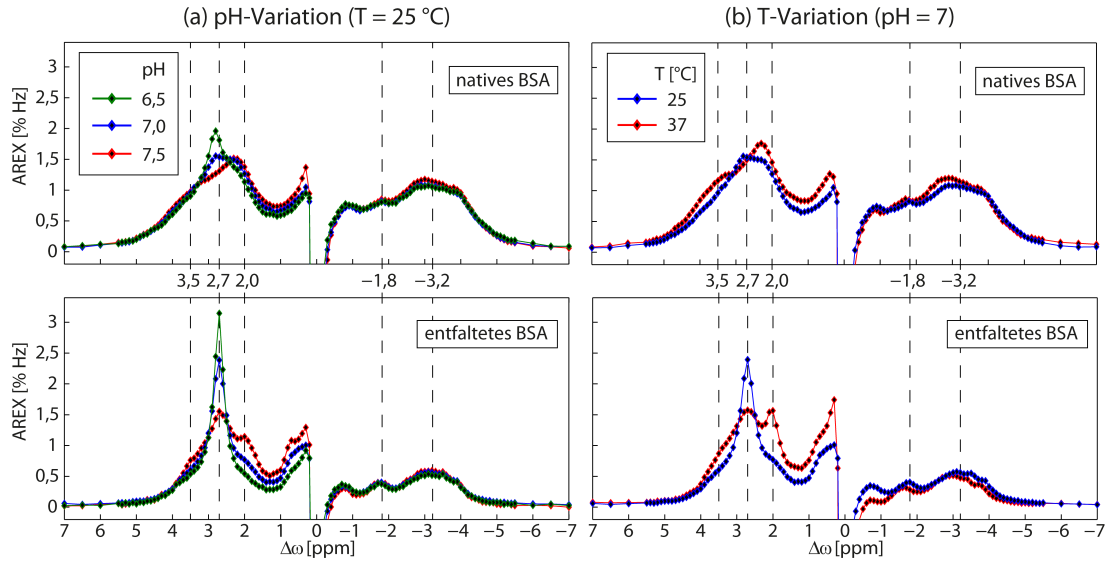


Abbildung 4.5: AREX-Spektren ($B_1 = 0,75 \mu\text{T}$, $t_{\text{sat}} = 12 \text{ s}$) von BSA bei (a) konstanter Temperatur und verschiedenen pH, sowie bei (b) konstantem pH und verschiedenen Temperaturen. Im Gegenteil zu nativem BSA (obere Reihe) enthalten die Modelllösungen von entfaltetem BSA (untere Reihe) eine Konzentration von 140 mM des Detergens SDS. Die gestrichelten Linien markieren die Frequenzoffsets der AREX-Denaturierungskurven in Abbildung 4.3. Die Abbildung wurde veröffentlicht in (Goerke u. a., 2015a).

Zur Überprüfung der Existenz eines Magnetisierungstransfer-Pfades zwischen Wasserprotonen und aromatischen Protonen in Proteinen, wurde die WEX-Spektroskopie (Unterabschnitt 3.2.4) verwendet. Wie erwartet traten im negativen Frequenzbereich der WEX-Spektren rNOE-Signale von aliphatischen Protonen auf (Abbildung 4.6 (a)). Zusätzlich sind jedoch Signale im positiven Frequenzbereich der WEX-Spektren detektierbar. Die WEX-Signale stimmen hinsichtlich ihrer spektralen Position, wie auch der relativen Intensität, mit den ^1H -Signalen in Abbildung 4.2 (b) überein. Dass es sich hierbei um rNOE-Signale von aromatischen Protonen handelt, konnte durch eine konstant bleibende Austauschrate der WEX-Signale unter Variation des pH-Werts bewiesen werden (vergleiche Abbildung 3.8 und 4.6 (b)); denn die Austauschraten stimmten bei verschiedenen pH-Werten innerhalb ihrer Fehler überein. Der Mittelwert ergab sich zu $k_{\text{sw},\text{mean}} = (2,69 \pm 0,46) \text{ Hz}$, bei einer mittleren T_1 -Relaxationsrate des Wassers von $R_{1\text{w},\text{mean}} = (0,30 \pm 0,03) \text{ Hz}$. Würden die Signale hingegen auf einem chemischen Austausch basieren, so wäre mit einer Änderung des pH-Werts ebenfalls eine Variation der Austauschrate zu erwarten (Abbildung 2.4). Die Existenz von rNOE-Signalen aromatischer Protonen im Bereich positiver Frequenzoffsets in der Z-Spektroskopie wurde zum ersten Mal im Rahmen dieser Arbeit gezeigt.

4 Ergebnisse

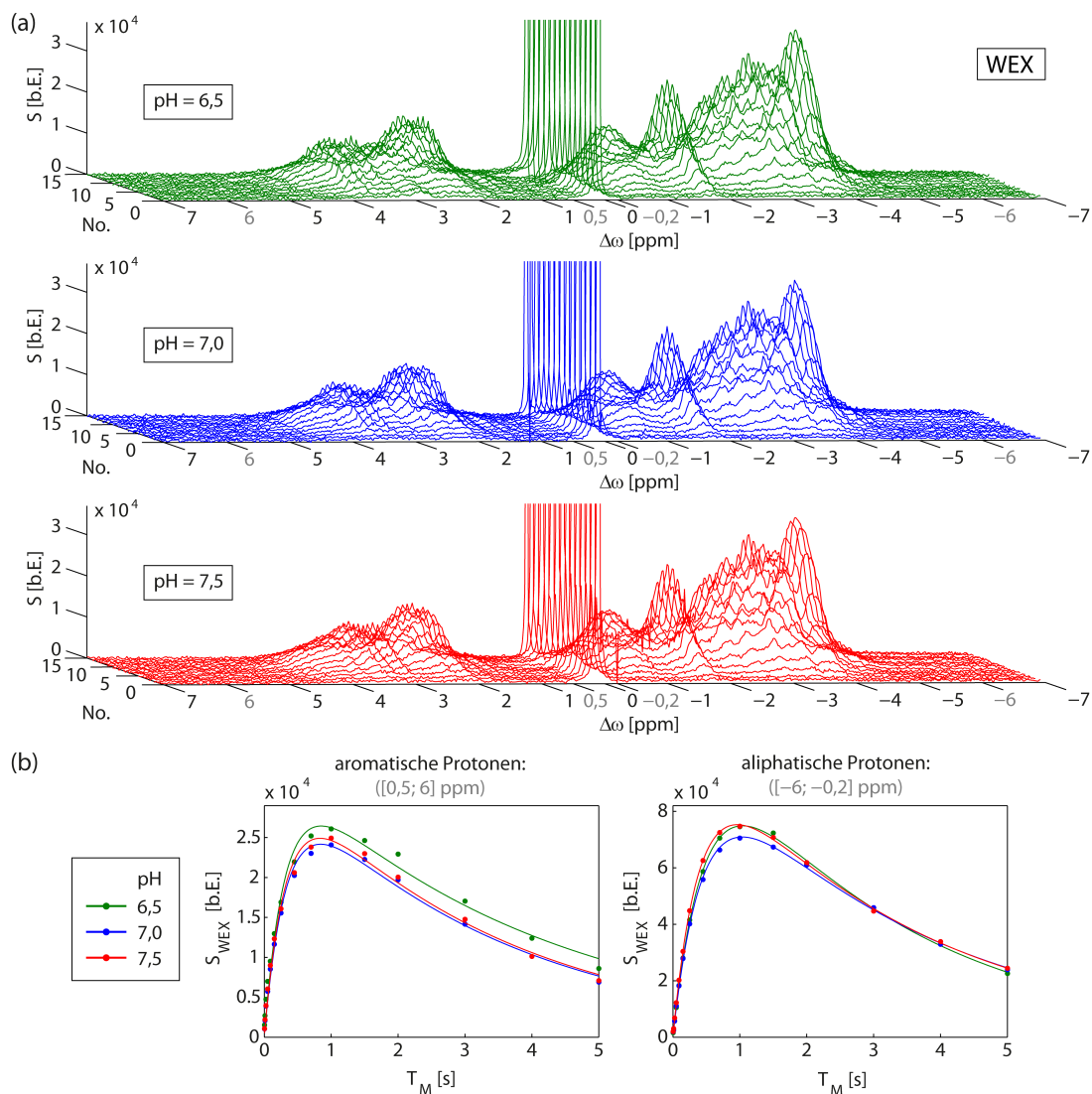


Abbildung 4.6: (a) WEX-Spektren von BSA bei verschiedenen pH und einer Temperatur von 25 °C. Durch die Aufnahme von Spektren bei 15 verschiedenen Mischungszeiten T_M konnte die komplette Dynamik der Austauschprozesse abgetastet werden. (b) Eine Integration der Spektren in den Frequenzbereichen [0,5; 6] und [-6; -0,2] ppm (graue Werte) führte zum WEX-Signal $S_{WEX}(T_M)$ von aliphatischen und aromatischen Protonen. Durch einen Fit mit der Funktion 3.15 konnten die effektive Austauschrate k_{sw} , sowie die T_1 -Relaxationsrate des Wassersignals bestimmt werden.

Folglich können ansteigende Sättigungstransfer-Effekte unter Protein-Entfaltung mit chemisch austauschenden Protonen in Verbindung gebracht werden, während verminderte Sättigungstransfer-Effekte auf rNOE-Signale zurückgeführt werden können. Diese charakteristischen Signaländerungen unter Protein-Entfaltung wurden in einer Signatur der Protein-Entfaltung zusammengefasst (Goerke u. a., 2015a).

Signatur der Protein-Entfaltung

- (i) rNOE-Signale werden abgeschwächt
- (ii) CA-Signale werden verstärkt

Da die Information über den Faltungszustand von Proteinen im Wassersignal gespeichert und detektiert wurde, kann die Signatur als ein MRT-Kontrast visualisiert werden (Abbildung 4.7).

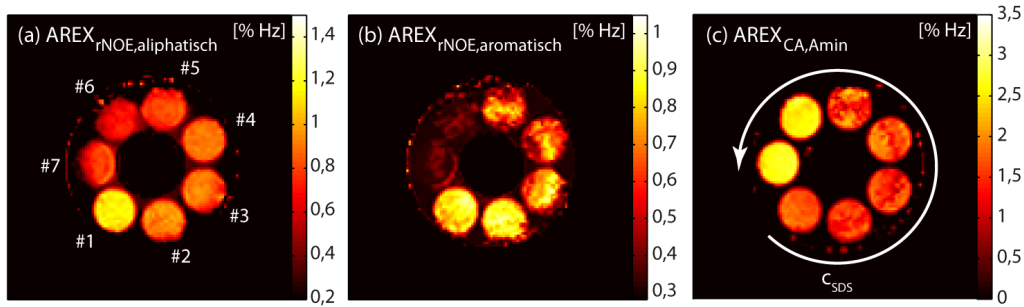


Abbildung 4.7: Die Signatur der Protein-Entfaltung dargestellt als MRT-Kontrast unter Verwendung der AREX-Auswertung (a)-(c) ($B_{1,mean} = 0,9 \mu\text{T}$, $t_{sat} = 11,25 \text{ s}$). Die Modelllösungen ($pH = 7$, $T = 25^\circ\text{C}$) enthalten BSA, sowie verschiedene Konzentrationen des Detergens SDS (#1: 0; #2: 8; #3: 15; #4: 23; #5: 30; #6: 80; #7: 140 mM), wodurch die Denaturierungskurven als Bildkontrast zwischen nativem (#1) und entfaltetem (#7) BSA dargestellt werden konnten. CA-Effekte von Amin-Protonen (c) wurden mit Hilfe eines Multi-Lorentz-Fit von unterliegenden rNOE-Signalen von aromatischen Protonen (b) separiert. Die Abbildung wurde veröffentlicht in (Goerke u. a., 2015a).

4.1.3 Ursprung der CEST-Signaländerungen unter Protein-Entfaltung

Ausschlaggebend für die Signalstärke eines CEST-Effekts im AREX-Spektrum ist die Austauschrate k_{sw} , sowie das Protonen-Verhältnis f_s (Gleichung 3.9). Im Hinblick auf die beobachteten CEST-Signaländerungen unter Protein-Entfaltung stellt sich daher die Frage, welchen Einfluss die Entfaltung auf diese beiden Parameter hat. Aufgrund der gegenläufigen Tendenz von rNOE- und CA-Signalen unter Protein-Entfaltung wurden diese im Folgenden separat voneinander untersucht. Die simultane Bestimmung der Änderungen in k_{sw} und f_s wurde dabei mittels zweier verschiedener quantitativer Methoden realisiert.

CA-Effekte

Zur Untersuchung des Ursprungs der CEST-Signaländerungen von chemisch austauschenden Protonen unter Protein-Entfaltung wurde das Amin-Signal in BSA bei $\Delta\omega = 2,7 \text{ ppm}$ verwendet (Abbildung 4.8 (a)). Aufgrund der relativ großen Austauschrate dieser Protonen ($k_{sw} \gg R_{2s} \approx 50 \text{ Hz}$ (Sun u. a., 2007a)) konnte zur quantitativen Bestimmung von k_{sw} und f_s eine Erweiterung der sog. Ω -Plot-Methode (Unterabschnitt 3.3.3) verwendet werden (Abbildung 4.8

4 Ergebnisse

(b)). Beim Übergang von nativem zu entfaltetem BSA wurde dabei ein starker Anstieg in f_s von 0,225‰ auf 0,397‰ beobachtet, was einer Zunahme von 76,5 % entspricht. Bemerkenswerterweise blieb k_{sw} hingegen annähernd unverändert bei einem Mittelwert von (545 ± 28) Hz.

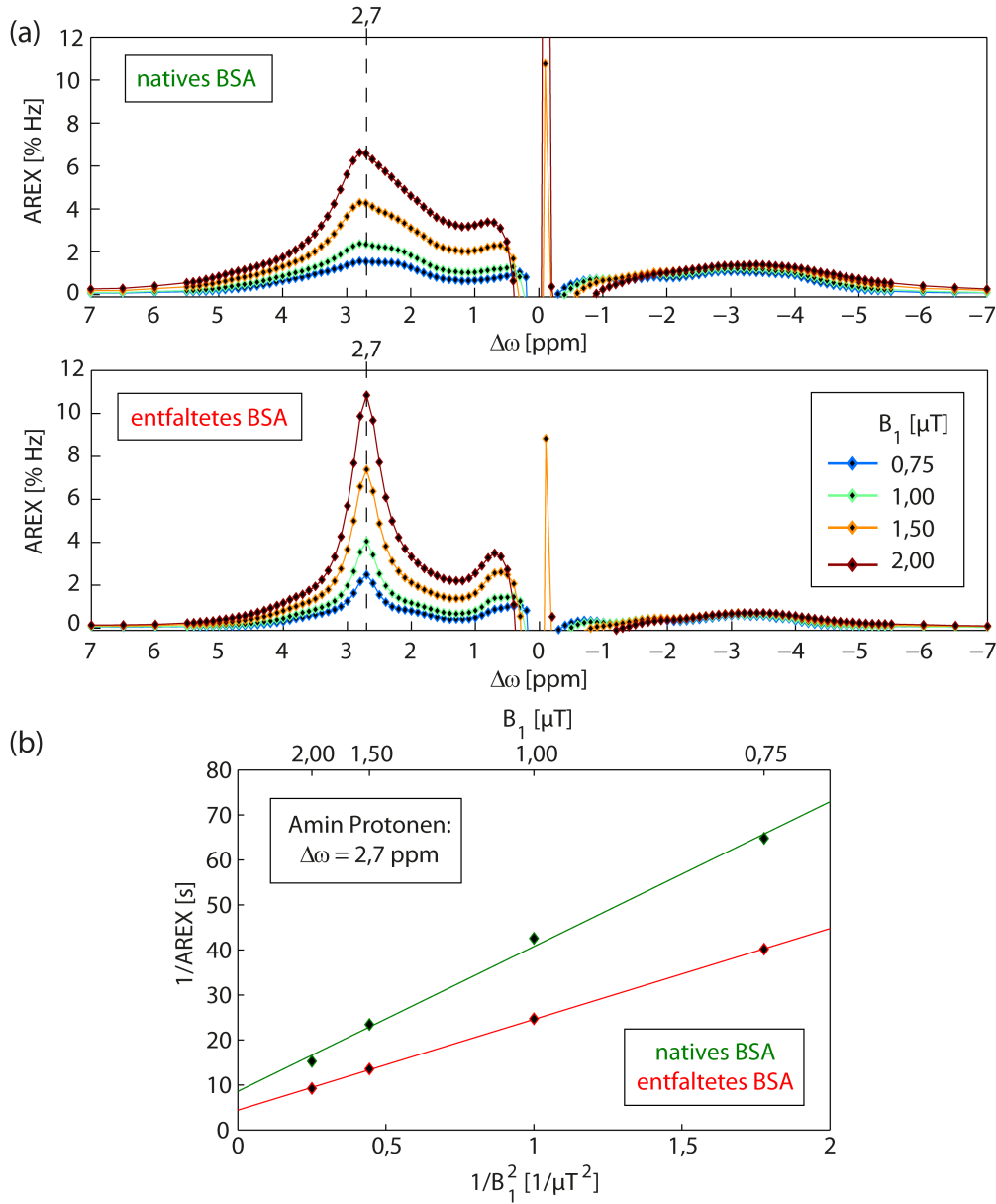


Abbildung 4.8: (a) AREX-Spektren ($t_{sat} = 12$ s) von BSA bei $pH = 7$ und $T = 25^\circ\text{C}$. Eine Entfaltung von BSA wurde durch Zugabe von 140 mM des Detergens SDS herbeigeführt. Zur quantitativen Bestimmung von k_{sw} und f_s wurden Spektren bei jeweils vier verschiedenen RF-Amplituden B_1 aufgenommen. (b) Lineare Regression der inversen AREX-Werte beim Frequenzoffset der Amin-Protonen-Resonanz ($\Delta\omega = 2,7$ ppm). Die Abbildung wurde veröffentlicht in (Goerke u. a., 2015a).

rNOE-Signale

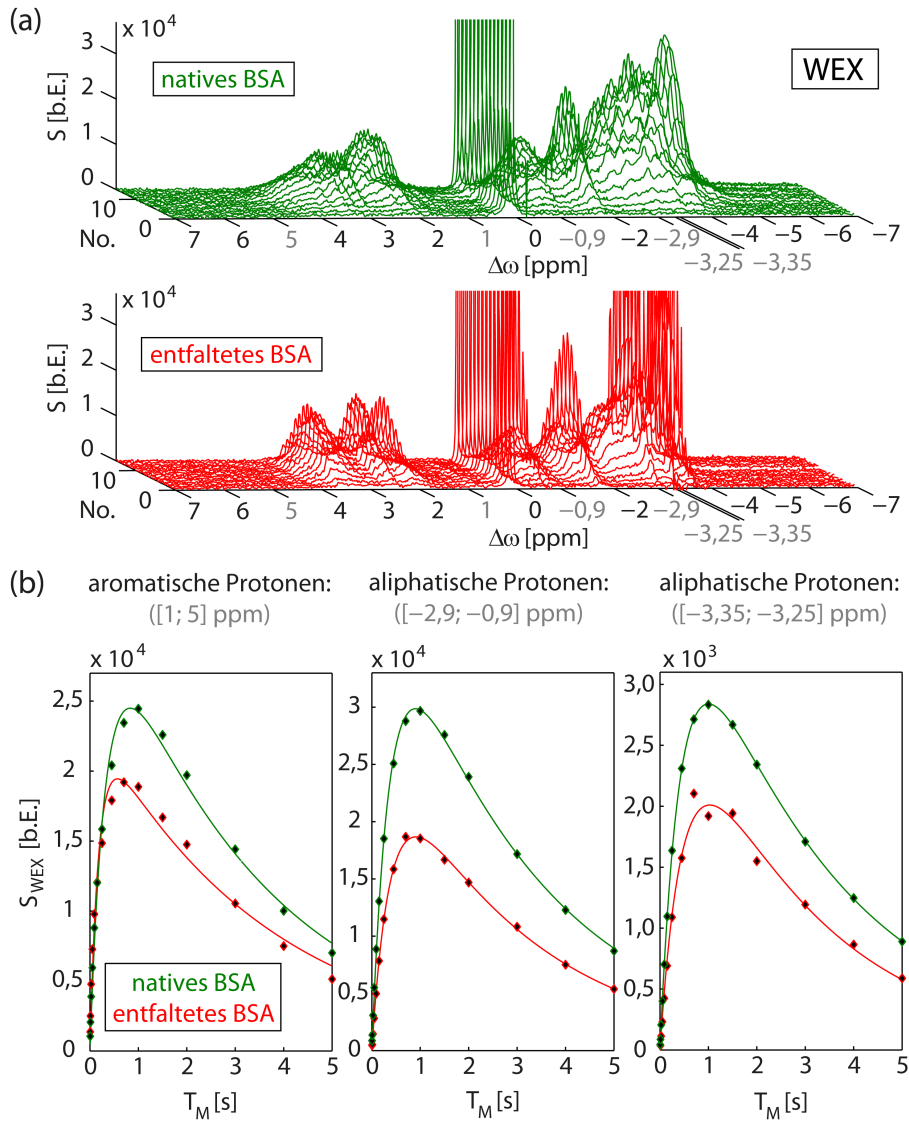


Abbildung 4.9: (a) WEX-Spektren von BSA bei $pH = 7,5$ und $T = 25^\circ\text{C}$. Eine Entfaltung von BSA wurde durch Zugabe von 140mM des Detergens SDS herbeigeführt. Durch Aufnahme der Spektren bei 15 verschiedenen Mischungszeiten T_M konnte die komplette Dynamik der Austauschprozesse abgetastet werden. (b) Eine Integration der Spektren in den Frequenzbereichen $[1; 5]$, $[-2,9; -0,9]$ und $[-3,35; -3,25]$ ppm (graue Werte) führte zum WEX-Signal $S_{WEX}(T_M)$. Um Beiträge zu S_{WEX} durch das Detergens zu vermeiden, wurden die Integrationsgrenzen außerhalb der Signale von SDS gewählt (vergleiche Abbildung 4.2). Durch einen Fit mit der Funktion 3.15 konnte somit die Änderung von k_{sw} und f_s , sowie der T_1 -Relaxation des Wassersignals unter Protein-Entfaltung bestimmt werden. Die Abbildung wurde veröffentlicht in (Goerke u. a., 2015a).

Für die Untersuchung des Ursprungs der CEST-Signaländerungen von aliphatischen und aromatischen Protonen unter Protein-Entfaltung konnte, aufgrund der vergleichsweise kleinen effektiven Austauschraten ($k_{sw} \ll R_{2s} \approx 3000 \text{ Hz}$ (Liu u. a., 2013)), nicht dieselbe Evaluierungsmethode wie zuvor für die Amin-Protonen verwendet werden. Eine quantitative Bestimmung der Änderungen in k_{sw} und f_s war allerdings mittels WEX-Spektroskopie (Unterabschnitt 3.2.4) möglich. Durch Verwendung eines relativ hohen pH von 7,5 konnten dabei alle Signale von chemisch austauschenden Protonen unterdrückt werden (Abbildung 4.9 (a)). Beim Übergang von nativem zu entfaltetem BSA wurde ein starker Abfall in f_s mit einer mittleren Abnahme von $\Delta f_{s,mean} = (30,3 \pm 5,3) \%$ beobachtet (vergleiche Abbildung 3.8 und 4.9 (b)). Die effektive Austauschrate k_{sw} hingegen blieb bemerkenswerterweise ebenfalls annähernd unverändert bei einem Mittelwert von $k_{sw,mean} = (3,03 \pm 1,19) \text{ Hz}$. Die mittlere T_1 -Relaxationszeit des Wassers betrug $R_{1w,mean} = (0,32 \pm 0,03) \text{ Hz}$.

Verallgemeinerung für CA- und rNOE-Signale

Im Allgemeinen kann die beschriebene Signatur der Protein-Entfaltung somit im Wesentlichen auf Änderungen des Protonen-Verhältnisses f_s zurückgeführt werden. Dabei kommt es zu einem Anstieg in f_s für CA-Signale und zu einer Abnahme von f_s für rNOE-Signale. Da sich jedoch die Anzahl an Protonen in den Proteinen durch die Entfaltung nicht verändert, kann der Parameter f_s im Kontext der Protein-Denaturierung lediglich als das Verhältnis an Protonen, die mittels CEST detektierbar sind, verstanden werden. Die effektiven Magnetisierungstransfer-Raten der detektierbaren Protonen sind dabei bemerkenswerterweise unabhängig vom Faltungszustand der Proteine. Diese Erkenntnisse sind entscheidend für das Verständnis des Einflusses von Denaturierung auf den ^1H -Magnetisierungstransfer zwischen Proteinen und freiem Wasser auf einer molekularen Ebene (siehe Diskussion Unterabschnitt 5.1.4).

4.2 Aggregation von Monomeren

Weisen Proteine eine gewisse Anzahl freiliegender hydrophober Aminosäuren auf, so kann es vorkommen, dass diese zu großen Strukturen rigider Komplexe aggregieren. Im Folgenden wird der Einfluss von Aggregation auf die CEST-Effekte von Proteinen anhand von HTT-Proteinen (Unterabschnitt 4.2.1), sowie der Peptide A β (Unterabschnitt 4.2.2), untersucht. Dabei konnten charakteristische Signaländerungen detektiert werden, die in Analogie zur Protein-Entfaltung in einer Signatur der Protein-Aggregation zusammengefasst wurden. Somit ist prinzipiell eine Unterscheidung von Protein-Entfaltung und -Aggregation mittels CEST möglich.

4.2.1 Huntingtin (HTT)-Protein

In den Modelllösungen der HTT-Proteine waren diverse Substanzen enthalten, welche für die Extraktion und Konservierung erforderlich waren. Im Z-Spektrum einer Kontrolllösung, die alle diese Stoffe enthielt, jedoch keine HTT-Proteine, konnten starke Sättigungstransfer-Effekte von Hydroxyl-Protonen ($-OH$) im Bereich zwischen -1 und 2 ppm beobachtet werden. (Abbildung 4.10). Diese CEST-Signale skalieren ebenfalls mit der Konzentration der HTT-Proteine c_{HTT} , da mit einem größeren Anteil der Protein-Stocklösung notwendigerweise auch die Konzentration der anderen Substanzen zunimmt. Somit konnte der Einfluss von Aggregation auf die CEST-Effekte von HTT-Proteinen lediglich bei Frequenzoffsets, welche nicht mit den Resonanzen dieser Hydroxyl-Protonen übereinstimmen, untersucht werden.

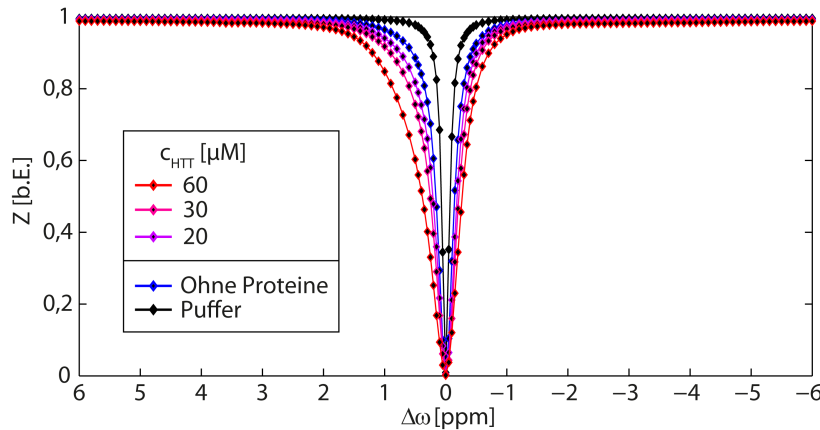


Abbildung 4.10: Z-Spektren ($B_1 = 0,8 \mu T$, $t_{sat} = 12$ s) von HTT-Proteinen bei $pH = 7,7$ und $T = 25^\circ C$. Mit zunehmender Konzentration der Proteine ist eine Verstärkung der Sättigungstransfer-Effekte im Bereich zwischen $\Delta\omega \approx \pm 1,5$ ppm zu beobachten. Hierbei handelt es sich jedoch um die CEST-Effekte von Substanzen, die zur Extraktion und Konservierung der Proteine verwendet wurden. Dies wird anhand eines Vergleichs der beiden Kontrolllösungen, die keine HTT-Proteine enthalten (blaue und schwarze Linien), deutlich. CEST-Effekte der HTT-Proteine sind lediglich im Bereich weniger %o erkennbar.

Isolierte CEST-Effekte der HTT-Proteine sind aufgrund einer geringen Protein-Konzentration von lediglich einigen $10 \mu M$ in der Größenordnung von %o beobachtbar (Abbildung 4.11).

Wie in den AREX-Spektren von BSA waren rNOE-Signale von aliphatischen bzw. aromatischen Protonen im Bereich negativer bzw. positiver Frequenzoffsets detektierbar. Zusätzlich trat ein dominantes CA-Signal bei $\Delta\omega = 3,5\text{ ppm}$ auf, das mit Amid-Protonen in Verbindung gebracht werden kann (Unterabschnitt 4.1.2, Paragraph 3). Für die Referenzmessung nativer HTT-Proteine konnte die Aggregation durch Anbindung des Enzyms GST verhindert werden (Unterabschnitt 3.5.2). Die Abspaltung von GST mittels eines weiteren Enzyms PSP ermöglichte somit die Detektion der CEST-Signaländerungen unter Aggregation. Dabei wurde, wie bei der Protein-Entfaltung, eine Abschwächung von rNOE-Signalen beobachtet. Außerdem wurde im aggregierten Zustand ebenfalls eine Abnahme der CA-Effekte beobachtet, wodurch Aggregationsprozesse prinzipiell von der Protein-Entfaltung unterschieden werden können. Die T_1 -Relaxationszeit des Wassersignals lag unabhängig vom Faltungszustand der HTT-Proteine bei $(3,00 \pm 0,03)\text{ s}$. Zudem waren keine störenden Sättigungstransfer-Effekte der verwendeten Enzyme GST und PSP detektierbar.

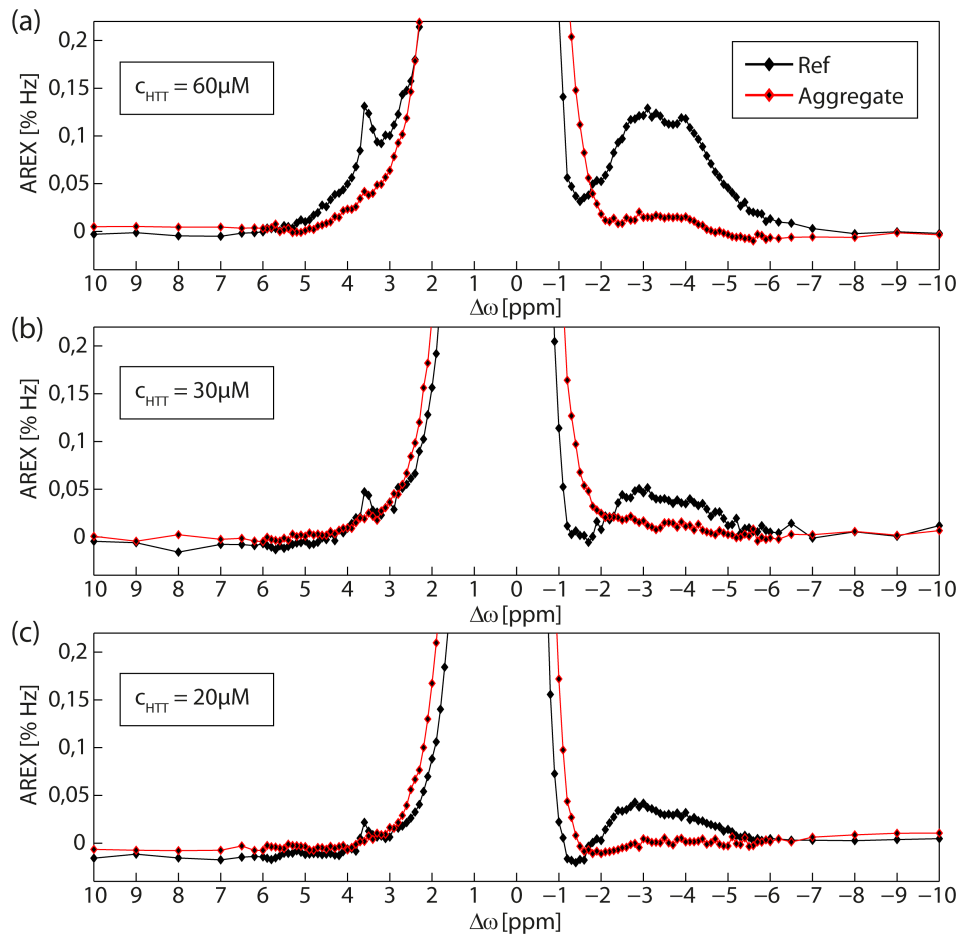


Abbildung 4.11: AREX-Spektren ($B_1 = 0,8\text{ }\mu\text{T}$, $t_{\text{sat}} = 12\text{ s}$) von HTT-Proteinen bei $pH = 7,7$ und $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$. rNOE- und CA-Signale nativer HTT-Proteinen von wenigen %o sind erkennbar (schwarze Linien). Die Signalstärken skalieren dabei linear mit der Konzentration c_{HTT} . Im aggregierten Zustand wurde eine Abnahme aller CEST-Effekte der HTT-Proteine beobachtet (rote Linien).

4.2.2 β -Amyloid ($A\beta$)

Der Einfluss von Aggregation auf die CEST-Effekte von Proteinen wurde auch anhand von β -Amyloiden untersucht. Im Gegensatz zu den Modelllösungen mit HTT-Proteinen traten hierbei keinerlei Signale anderer Substanzen, die zur Extraktion der Proteine verwendet wurden, auf (Abbildung 4.12 (a)). Dies erlaubte die Detektion von Signaländerungen unter Aggregation über den gesamten Bereich endogener CEST-Effekte. Aufgrund der kleineren Molekülgröße von $A\beta$ im Vergleich zu HTT-Proteinen waren jedoch lediglich CEST-Effekte in der Größenordnung von 1/10 ‰ detektierbar (Abbildung 4.12 (b)). Dabei konnten rNOE-Signale von aliphatischen bzw. aromatischen Protonen im Bereich negativer bzw. positiver Frequenzoffsets identifiziert werden. Zudem war ebenfalls ein dominanter CA-Effekt von Amid-Protonen bei $\Delta\omega = 3,6$ ppm aufgelöst.

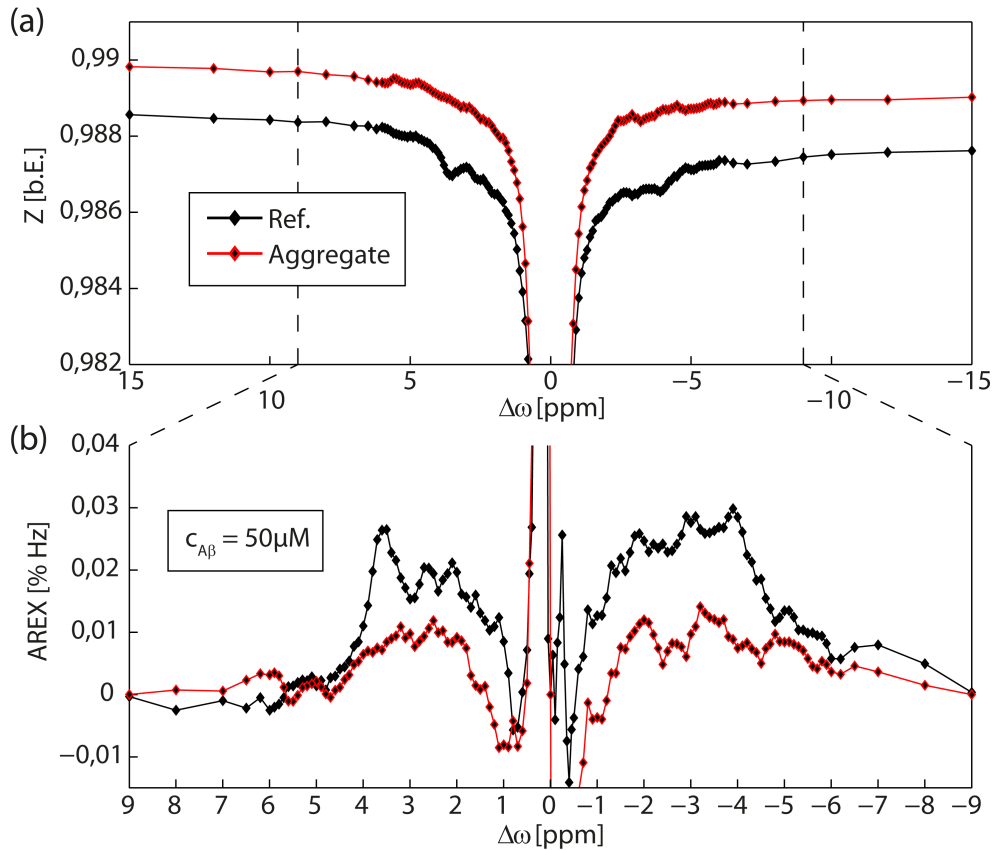


Abbildung 4.12: (a) Z- und (b) AREX-Spektren ($B_1 = 0,75 \mu\text{T}$, $t_{\text{sat}} = 14 \text{ s}$) von $A\beta$ bei $\text{pH} = 7,2$ und $T = 37^\circ\text{C}$. Wegen der geringen Signalstärke der CEST-Effekte in der Größenordnung von 1/10 ‰ wurden die Spektren an jedem Frequenzoffset durch eine Mittelung mit den unmittelbar benachbarten Datenpunkten geglättet. Die Spektren der Aggregate wurden 24 h nach der Referenzmessung der nativen Proteine aufgenommen.

Die Aggregation von $A\beta$ wurde unweigerlich direkt bei der Herstellung der Modelllösungen durch das Justieren des pH in den Bereich physiologischer Werte initiiert (Unterabschnitt 3.5.3).

4 Ergebnisse

Eine Referenzmessung an nativen Proteinen konnte jedoch aufgrund der relativ langsamen Dynamik des Aggregationsprozesses (≈ 24 h) unmittelbar nach dem Ansetzen der Modelllösung durchgeführt werden. Durch Vergleich mit einer erneuten Messung nach 24h konnten somit CEST-Signaländerungen unter Aggregation identifiziert werden. Dabei wurde – in Einklang mit den Untersuchungen von HTT-Proteinen – eine Abnahme aller rNOE- und CA-Signale von A β beobachtet. Die T_1 -Relaxationszeit des Wassersignals lag unabhängig vom Faltungszustand der Proteine bei $(3,37 \pm 0,01)$ s.

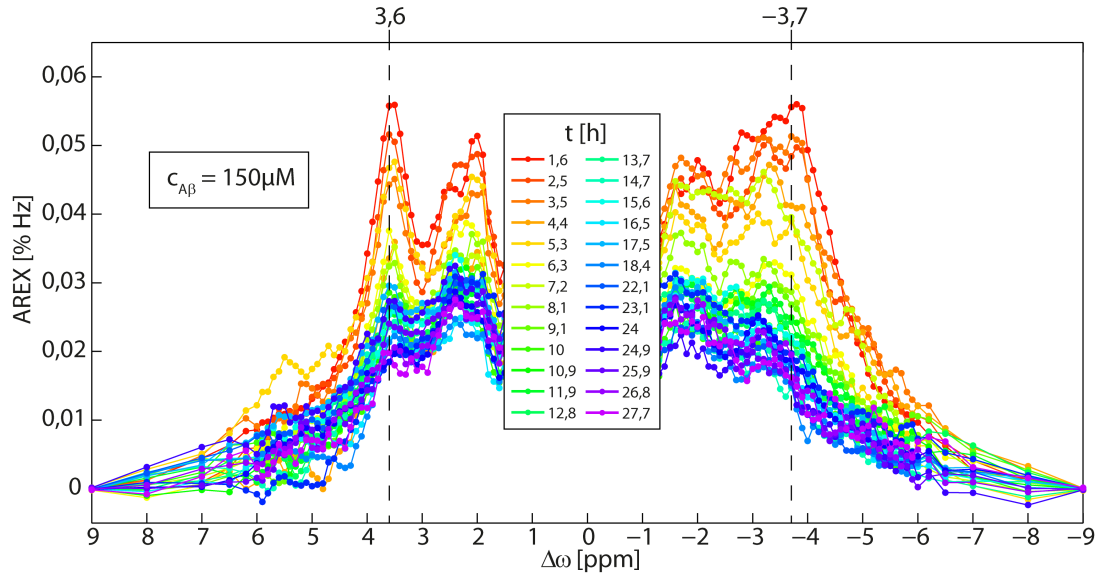


Abbildung 4.13: AREX-Spektren ($B_1 = 0,75 \mu\text{T}$, $t_{\text{sat}} = 14$ s) von A β bei $pH = 7,2$ und $T = 37^\circ\text{C}$. Der zeitliche Verlauf der Spektren zeigt die CEST-Signaländerungen unter Aggregation. Wegen des geringen Signal-Rausch-Verhältnisses wurden die Spektren an jedem Frequenzoffset durch eine Mittelung mit den unmittelbar benachbarten Datenpunkten geglättet.

Zur besseren Auflösung einzelner Resonanzen wurde für die Aufnahme der Dynamik des Aggregationsprozesses eine dreifach erhöhte Konzentration $c_{A\beta}$ verwendet (Abbildung 4.13). Die T_1 -Relaxationszeit des Wassersignals war hier ebenfalls unabhängig vom Faltungszustand der Proteine und hatte einen Wert von $(3,94 \pm 0,02)$ s. Der Verlauf der CEST-Signaländerungen als Funktion der Zeit wurde mit Hilfe von AREX-Denaturierungskurven dargestellt. Dabei wurden die folgenden Effekte untersucht (Abbildung 4.14): (i) rNOE aliphatischer Protonen ($\Delta\omega = -3,7$ ppm), (ii) rNOE aromatischer Protonen (TPM, Ref bei $\Delta\omega = 3,6$ ppm) und (iii) CA von Amid-Protonen (TPM bei $\Delta\omega = 3,6$ ppm). Alle drei Denaturierungskurven wiesen, unabhängig von der Art des zugrundeliegenden Magnetisierungstransfer-Mechanismus (rNOE oder CA), denselben exponentiellen Abfall als Funktion der Zeit auf. Anhand des Verlaufs der Denaturierungskurven konnte der Aggregationsprozess in zwei charakteristische Phasen gegliedert werden. Während der Aggregation kam es zu einem Abfall der Denaturierungskurven um ca. $-6\%/h$. Die anschließende Sättigung hingegen zeichnete sich durch ein konstantes Signal aus, welches als starker Hinweis auf eine vollständige Aggregation der Proteine anzusehen ist. Somit ist wie bei der Protein-Entfaltung die Information über den Verlauf der Aggregation in verschie-

denen Sättigungstransfer-Effekten bei diversen Frequenzoffsets im AREX-Spektrum enthalten. Diese charakteristischen Signaländerungen können in einer Signatur der Protein-Aggregation zusammengefasst werden.

Signatur der Protein-Aggregation

- (i) rNOE-Signale werden abgeschwächt
- (ii) CA-Signale werden abgeschwächt

Diese unterscheidet sich im Vergleich zur Signatur der Protein-Entfaltung (Unterabschnitt 4.1.2) durch die gleichermaßen abgeschwächten CA-Effekte, wodurch prinzipiell eine Differenzierung von Entfaltungs- und Aggregationsprozessen mittels CEST möglich ist.

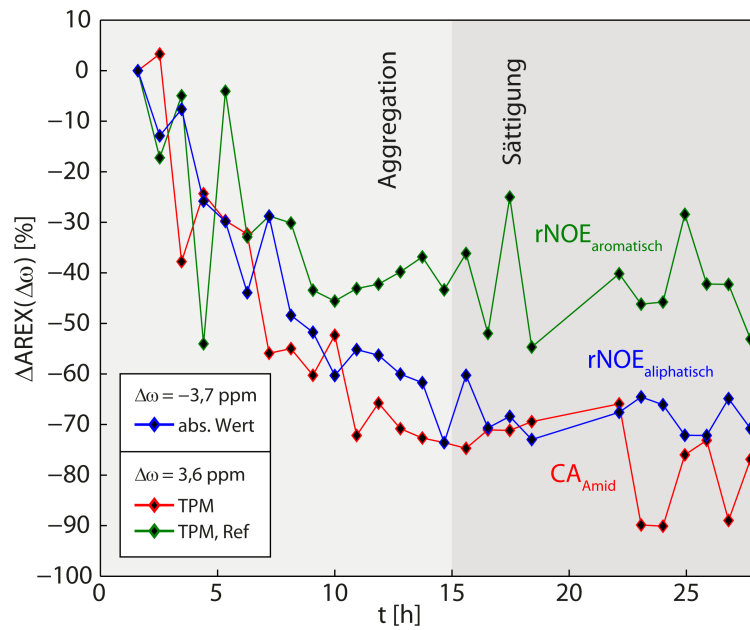


Abbildung 4.14: AREX-Denaturierungskurven bei verschiedenen Frequenzoffsets $\Delta\omega$ als Funktion der Zeit. Für die Separation des CA-Signals von Amid-Protonen bei $\Delta\omega = 3,6\text{ ppm}$ vom Untergrund der rNOE-Signale von aromatischen Protonen wurde die Drei-Punkt-Methode verwendet (Unterabschnitt 3.3.1). Nach einer Dauer von $\approx 15\text{ h}$ ist eine Sättigung (dunkelgraue Fläche) des Aggregationsprozesses erkennbar. Die Denaturierungskurven wurden mittels der AREX-Spektren in Abbildung 4.13 berechnet.

4.3 Denaturierung von Hefezellen-Lysaten

In den bisher beschriebenen Messungen wurden einzelne spezifische Protein-Isoformen verwendet, um gesondert den Einfluss von Entfaltung oder Aggregation auf die CEST-Signale zu untersuchen. An einem lebenden Organismus misst man dagegen eine komplexe Überlappung von Signalen verschiedenster Proteine, wodurch mit CEST *in vivo* lediglich ein mittleres Signal des gesamten Proteoms detektiert werden kann. Im Folgenden wird exemplarisch die Denaturierung des Lysats von eukaryotischen Hefezellen untersucht (Unterabschnitt 4.3.2 und 4.3.3), welches ein heterogen zusammengesetztes Gemisch von Proteinen darstellt.

CEST-Effekte intakter Hefezellen

Im Gegensatz zu Z-Spektren von wässrigen Lösungen von Proteinen, beobachtet man in Z-Spektren von lebenden Organismen eine breitbandige Resonanz rigider makromolekularer Strukturen (ssMT, Unterabschnitt 2.2.4). In Hefezellen ist unter Verwendung kleiner RF-Amplituden ($B_1 < 1 \mu\text{T}$) eine Effektstärke des ssMT von einigen % mit einer Halbwertsbreite von $FWHM_{ssMT} \approx 15 \text{ kHz}$ detektierbar (Abbildung 4.15 (a)). Eine Separation selektiver CEST-Signale im Bereich zwischen $\Delta\omega \approx \pm 7 \text{ ppm}$ war somit lediglich durch eine zusätzliche Korrektur des ssMT möglich. In Übereinstimmung mit den CEST-Signalen gelöster Proteine sind im positiven Frequenzbereich der AREX-Spektren von Hefezellen drei gesonderte Resonanzen bei 2,0, 2,7 und 3,6 ppm aufgelöst (Abbildung 4.15 (b)). Im weiteren Verlauf konnte in Hefezellen-Lysaten gezeigt werden, dass diese auf einen CA zurückgeführt werden können (Abbildung 4.17). rNOE-Signale von aliphatischen Protonen waren im negativen Bereich der Frequenzoffsets detektierbar. Das Auftreten von rNOE-Signalen aromatischer Protonen im positiven Bereich der Frequenzoffsets konnte ebenfalls im weiteren Verlauf dieser Arbeit mit Hilfe der Hefezellen-Lysate bestätigt werden (Abbildung 4.17).

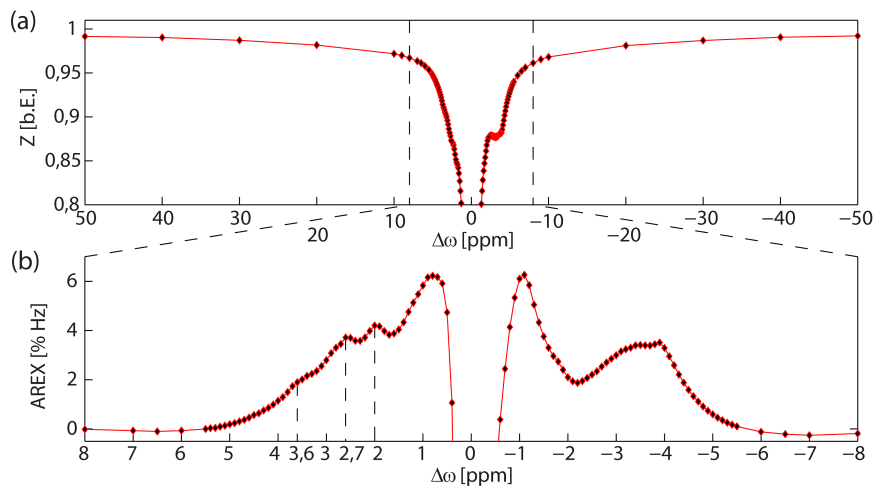


Abbildung 4.15: (a) Z-Spektren ($B_1 = 0,6 \mu\text{T}$, $t_{sat} = 4 \text{ s}$) von intakten Hefezellen bei $pH \approx 6,6$ und $T = 25^\circ\text{C}$. (b) Eine Separation selektive Sättigungstransfer-Effekte mit Hilfe der AREX-Methode (Unterabschnitt 3.3.1) ist auch bei Vorhandensein eines breitbandigen ssMT möglich. Die T_1 -Relaxationszeit des Wassersignals wurde zu 1,53 s bestimmt.

Aufgrund überlappender CEST-Signale anderer intrazellulärer Komponenten, z.B. Metaboliten im Z-Spektrum, können die beobachteten CEST-Effekte allerdings nicht ausschließlich auf Proteine zurückgeführt werden. Eine selektive Detektion der Gesamtheit aller Proteine *in vivo* ist jedoch mittels nachfolgender CEST-Effekte möglich (Unterabschnitt 2.4.3):

- (i) rNOE von aliphatischen ($\Delta\omega < 0$ ppm) und aromatischen ($\Delta\omega > 0$ ppm) Protonen
- (ii) CA von Amid-Protonen ($\Delta\omega \approx 3,5$ ppm)

4.3.1 Das Hefezellen-Lysat

Im Folgenden wird allein der lösliche Teil des Proteoms von Hefezellen verwendet, um die Denaturierung eines heterogen zusammengesetzten Gemischs von Proteinen zu untersuchen. Der Zellaufschluss und die anschließende Auftrennung der Bestandteile von Hefezellen in verschiedene Kompartimente mit unterschiedlichen Molekülgrößen wurde mittels des in Unterabschnitt 3.5.4 beschriebenen Lyse-Verfahrens realisiert (Tabelle 4.1).

| Kompartiment | Gemisch | Komponenten |
|---------------------|------------|--|
| Lysat | Lösung | alle löslichen Bestandteile einer Zelle (Proteine und Metaboliten) |
| semi-flüssige Phase | Suspension | kleine Fragmente von Zellorganellen (Proteine, Polysaccharide und Lipide) |
| semi-feste Phase | Suspension | große Fragmente von Zellorganellen (Proteine, Polysaccharide, Lipide und intakte Zellen) |

Tabelle 4.1: Mit Hilfe eines sog. Lyse-Verfahrens konnten die einzelnen Komponenten der Hefezellen in drei verschiedene Kompartimente getrennt werden, die anhand ihrer Viskosität und Farbe unterschieden wurden.

Das Auftreten einer dominanten breitbandigen Resonanz des ssMT in den Z-Spektren der semi-flüssigen und -festen Phase (Abbildung 4.16 (a)) steht in Einklang mit dem Vorkommen rigider makromolekularer Strukturen von Zellorganellen in diesen beiden Kompartimenten. Der größte Anteil selektiver CEST-Effekte hingegen ist im Lysat beobachtbar (Abbildung 4.16 (b)). Eine Auswertung der Sättigungstransfer-Effekte CA_{Amid} , $rNOE_{\text{aliphatisch}}$ und $rNOE_{\text{aromatisch}}$, welche hauptsächlich mit Proteinen in Verbindung gebracht werden können, ergab einen mittleren CEST-Signalanteil des löslichen Teil des Proteoms von $(69 \pm 11)\%$.

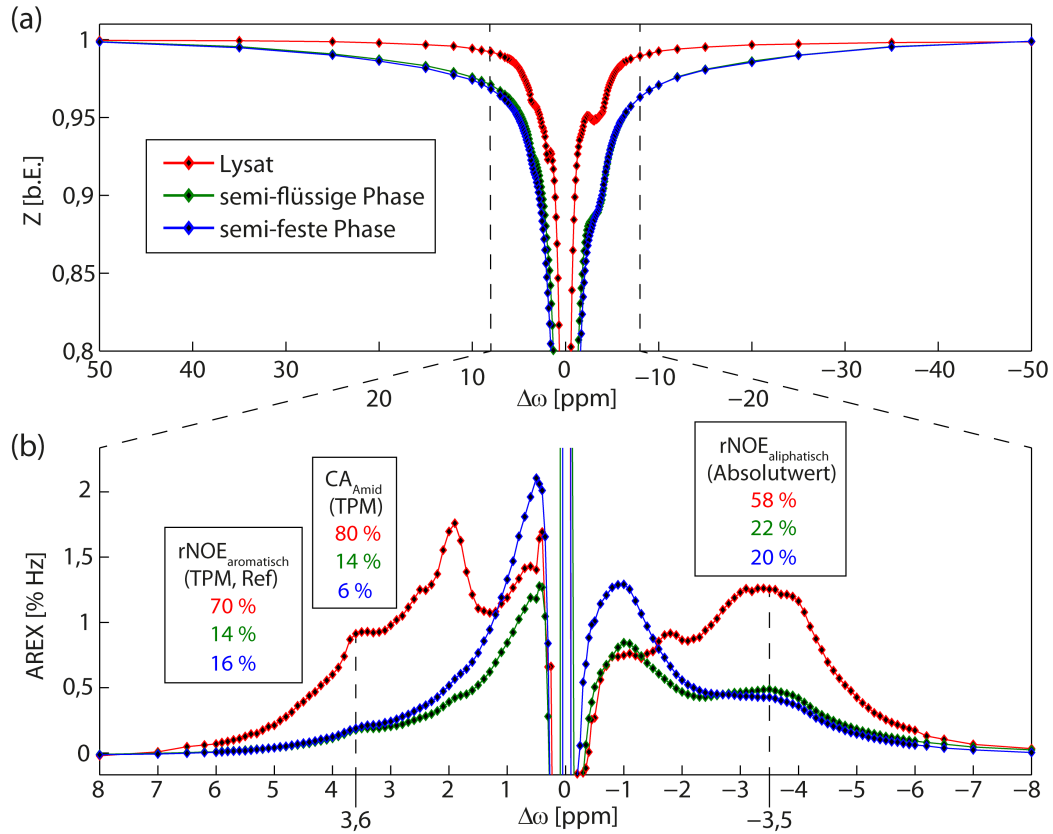


Abbildung 4.16: (a) Z-Spektren ($B_1 = 0,75 \mu T$, $t_{sat} = 14 s$) der einzelnen Kompartimente von lysierten Hefezellen bei $pH = 7,2$ und $T = 25^\circ C$. (b) Der prozentuale Signalanteil der CEST-Effekte, welche zur selektiven Detektion von Proteinen verwendet werden können, wurde anhand der AREX-Spektren berechnet (gestrichelte Linien). Der CA-Effekt von Amid-Protonen bei $\Delta\omega = 3,6 ppm$ konnte dabei mit Hilfe der Drei-Punkt-Methode (Unterabschnitt 3.3.1) vom Untergrund der rNOE-Signale von aromatischen Protonen separiert werden. Die T_1 -Relaxationszeit des Wassersignals im Lysat von 2,67 s war geringfügig größer im Vergleich zur semi-flüssigen bzw. -festen Phase mit 2,44 s bzw. 2,43 s.

Die Existenz eines rNOE von aromatischen Protonen in den Z-Spektren von Hefezellen-Lysaten, konnte mit Hilfe einer Variation des pH-Werts bestätigt werden (Abbildung 4.17). In Einklang mit der pH-Unabhängigkeit von rNOE-Signalen aliphatischer Protonen ($\Delta\omega < 0 ppm$), wurde dabei ein gleichermaßen konstanter Beitrag zum AREX-Spektrum im Bereich positiver Frequenzoffsets detektiert. Dieser pH-unabhängige Beitrag kann auf rNOE-Signale von aromatischen Protonen zurückgeführt werden. Zusätzlich waren drei Resonanzen bei $\Delta\omega = 2,0$, $2,7$ und $3,6 ppm$ aufgelöst, die eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert aufweisen und daher mit einem CA in Verbindung gebracht werden können. Eine Erhöhung der Temperatur von $25^\circ C$ auf einen physiologischen Wert von $37^\circ C$ führte zudem zu einer Verstärkung des CA-Effekts von Amid-Protonen um einen Faktor von ungefähr zwei.

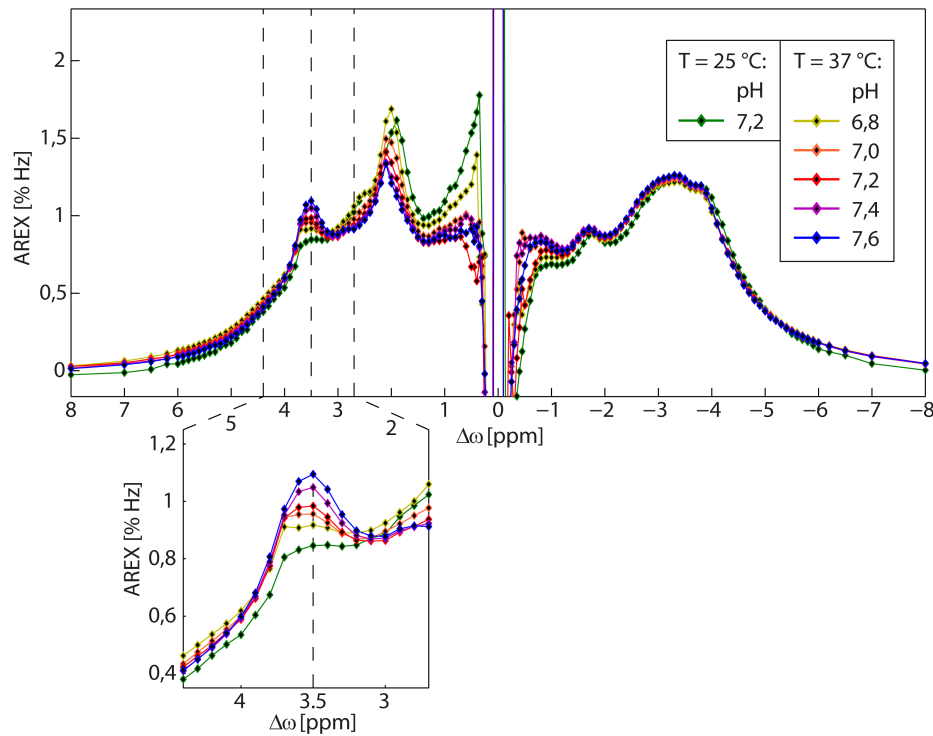


Abbildung 4.17: AREX-Spektren ($B_1 = 0,75 \mu\text{T}$, $t_{\text{sat}} = 14 \text{ s}$) des Hefezellen-Lysats bei verschiedenen pH und Temperaturen. Aufgrund der starken Abhängigkeit der CA-Signale von der Kinetik der zugrundeliegenden Säure-Base-Reaktion, können diese durch eine Änderung der Signalstärke mit variierendem pH identifiziert werden. Die T_1 -Relaxationszeit des Wassersignals wurde bei $T = 25^\circ\text{C}$ zu $2,78 \text{ s}$ bestimmt. Bei einer Temperatur von 37°C wurde mit steigendem pH T_1 -Werte von $3,33$, $3,38$, $3,47$, $3,57$ und $3,61 \text{ s}$ beobachtet.

4.3.2 Denaturierung mittels Hitzeschock

Die verschiedenen Kompartimente der lysierten Hefezellen wurden durch Hitzeschock denaturiert (Abbildung 4.18). Dabei wurde in allen Kompartimenten eine Abschwächung der rNOE-Signale von aliphatischen und aromatischen Protonen beobachtet. Bemerkenswerterweise ging die stärkste Abnahme mit einem mittleren relativen Anteil von $\Delta r\text{NOE} = (-81 \pm 1) \%$ vom Lysat aus. Somit kann die Detektion von rNOE-Signaländerungen unter Denaturierung in intakten Hefezellen hauptsächlich auf den löslichen Teil des Proteoms zurückgeführt werden. Die Abnahme der rNOE-Signale ist in Einklang mit der Signatur der Protein-Entfaltung und auch der Protein-Aggregation. Eine Differenzierung der beiden Vorgänge ist prinzipiell mittels des CA-Signals von Amid-Protonen möglich. Im Vergleich zur Gesamtabnahme der rNOE-Signale aller Kompartimente mit einem Mittelwert von $(-0,38 \pm 0,05) \%$ Hz war jedoch lediglich eine betragsmäßig um eine Größenordnung kleinere Gesamtzunahme des CA_{Amid} -Signals von $0,026 \%$ Hz beobachtbar. Eine Unterscheidung zwischen Protein-Entfaltung und -Aggregation mit Hilfe der aufgestellten Signaturen ist daher aufgrund der vernachlässigbar kleinen Änderung des CA-Signals von Amid-Protonen nicht möglich.

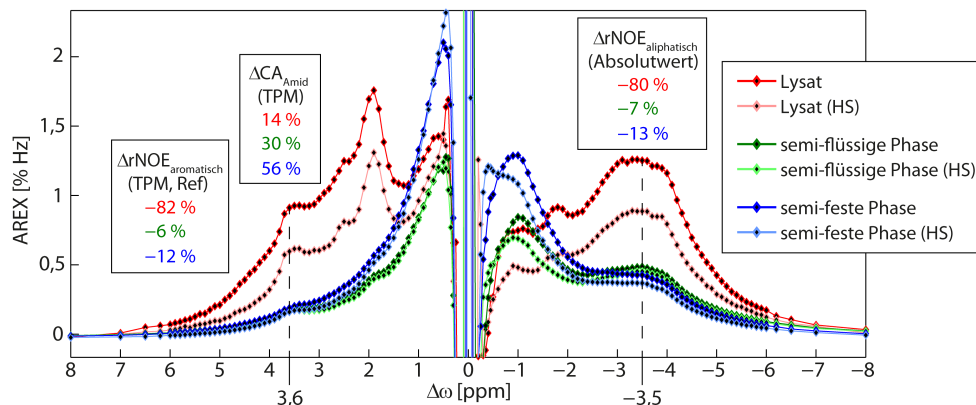


Abbildung 4.18: AREX-Spektren ($B_1 = 0,75 \mu\text{T}$, $t_{\text{sat}} = 14 \text{ s}$) der einzelnen Kompartimente von lysierten Hefezellen bei $\text{pH} = 7,2$ und $T = 25^\circ\text{C}$. Nach einem Hitzeschock (HS) mit 65°C über einen Zeitraum von 1 h wurden die gekennzeichneten relativen Änderungen ΔrNOE und ΔCA beobachtet. Die Referenzspektren ohne Hitzeschock entsprechen den AREX-Spektren in Abbildung 4.16. Die T_1 -Relaxationszeit des Wassersignals wurde durch den Hitzeschock leicht erhöht. Im Lysat wurde $T_1 = 2,78 \text{ s}$ gemessen, in der semi-flüssigen bzw. -festen Phase $T_1 = 2,59$ bzw. $2,54 \text{ s}$ (vergleiche Bildunterschrift Abbildung 4.16).

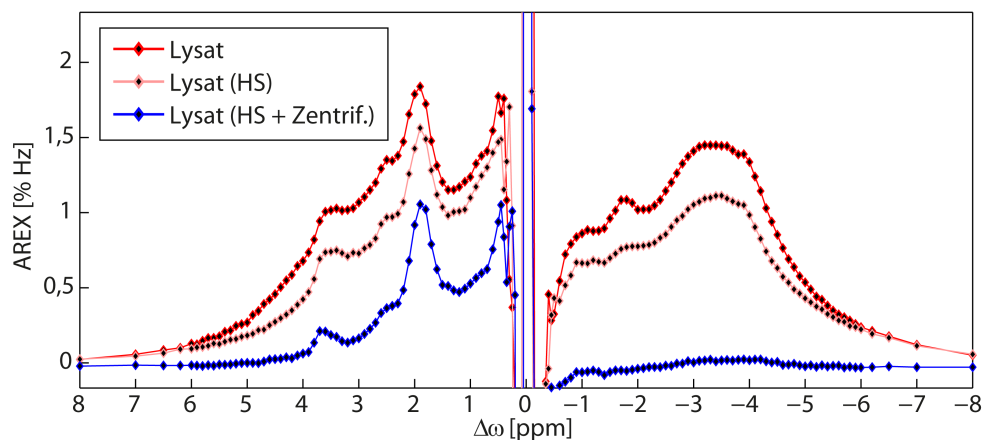


Abbildung 4.19: AREX-Spektren ($B_1 = 0,75 \mu\text{T}$, $t_{\text{sat}} = 14 \text{ s}$) des Hefezellen-Lysats bei $\text{pH} = 7,2$ und $T = 25^\circ\text{C}$. Nach einem einstündigen Hitzeschock (HS) mit 65°C wurde das Lysat bei 15000 g über einen Zeitraum von 1 h zentrifugiert und nach Isolierung der unlöslichen Komponenten erneut gemessen.

Eine Aggregat-Bildung von Proteinen kann jedoch nach Zentrifugation beobachtet werden. Im Hitze-geschockten Lysat sammelten sich unlösliche Komponenten, welche auf eine Protein-Aggregation unter Hitzeschock hinweisen im unteren Teil der Probe (Abbildung 4.19). Zudem trat eine milchige Trübung des Lysates beim Hitzeschock auf, welche durch die Zentrifugation aufgelöst werden konnte. Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine Protein-Aggregation unter Hitzeschock. Die Abwesenheit von rNOE-Signalen aliphatischer und aromatischer Protonen im AREX-Spektrum nach Isolation der unlöslichen Komponenten lässt auf eine vollständige Aggregation der Proteine schließen. Die T_1 -Relaxationszeit des Wassersignals im nativen Lysat wurde zu 2,65 s ermittelt. Nach dem Hitzeschock war, in Einklang mit den vorherigen Messungen, ein leichter Anstieg auf 2,71 s beobachtbar. Die Trennung der unlöslichen Komponenten führte zu einer weiteren leichten Zunahme von T_1 auf 2,79 s.

4.3.3 Denaturierung mittels SDS

Aufgrund der Unlöslichkeit der Komponenten in der semi-flüssigen und -festen Phase der lysierten Hefezellen (Tabelle 4.1) war eine Denaturierung mit Hilfe von SDS lediglich im Lysat möglich. Da das Lysat Proteine verschiedener Größen und nativer Faltungs-Konfigurationen enthält, ist eine Überlagerung diverser Denaturierungskurven als Funktion der SDS-Konzentration zu erwarten. Zur besseren Detektion des CA-Signals von Amid-Protonen wurde die Temperatur im Vergleich zu den vorherigen Messungen auf 37 °C erhöht (Abbildung 4.17).

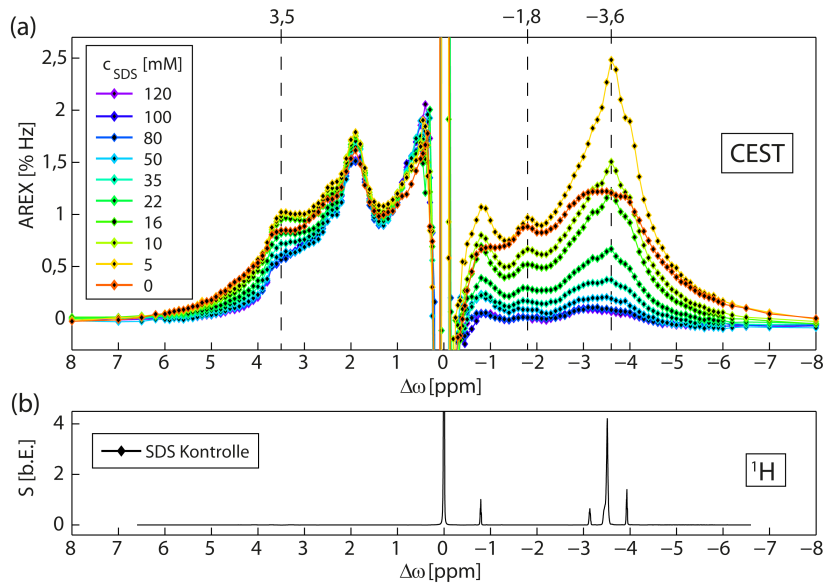


Abbildung 4.20: (a) AREX-Spektren ($B_1 = 0,75 \mu\text{T}$, $t_{\text{sat}} = 14\text{s}$) des Hefezellen-Lysats bei $\text{pH} = 7,2$ und $T = 37^\circ\text{C}$. Eine Denaturierung des Lysats wurde durch Zugabe des Detergens SDS hervorgerufen. (b) Um mögliche Störsignale des Detergens zu identifizieren, ist das ^1H -Spektrum von 100 mM SDS dargestellt. Die Resonanzfrequenzen der aliphatischen Protonen in SDS sind in der Bildunterschrift in Abbildung 4.2 vermerkt. Mit zunehmender Konzentration c_{SDS} wurde eine Verkürzung der T_1 -Relaxationszeit des Wassersignals auf 2,78, 2,49, 2,43, 2,43, 2,40, 2,38, 2,46, 2,37, 2,34 und 2,36 s beobachtet.

Durch Zugabe des Detergens war ein starker Anstieg der rNOE-Signale von aliphatischen Protonen, die mit den Frequenzoffsets von Protonen in SDS übereinstimmen ($\Delta\omega \approx -3,6$ und $-0,8$ ppm), zu beobachten (Abbildung 4.20 (a)). Dieser initiale Signalanstieg als Funktion von c_{SDS} steht im Widerspruch zu den vorherigen Messungen einzelner Protein-Isoformen, bei denen eine Abschwächung aller auftretenden rNOE-Signale unter Denaturierung gefunden wurde. rNOE-Signale von aliphatischen Protonen, die nicht mit den Frequenzoffsets von Protonen in SDS übereinstimmen ($\Delta\omega \approx -1,8$ ppm), zeigten in Einklang mit der Signatur der Protein-Entfaltung und -Aggregation einen monoton fallenden Verlauf als Funktion von c_{SDS} . Außerdem waren bei einer Kontrollmessung von reinem SDS in Lösung keinerlei CEST-Effekte detektierbar (Abbildung 4.2). Im Folgenden werden daher ansteigende rNOE-Signale im Bereich aliphatischer Protonen mit immobilisiertem SDS, welches an spezielle Proteine gebundenen wurde in Verbindung gebracht. Mittels CEST ist somit ebenfalls eine Interaktion von verschiedenen Molekülen untereinander detektierbar.

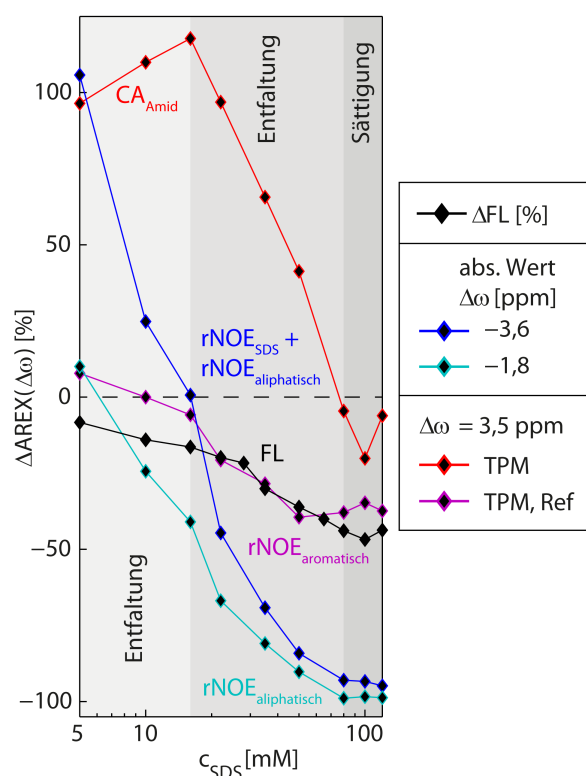


Abbildung 4.21: AREX-Denaturierungskurven bei verschiedenen Frequenzoffsets $\Delta\omega$ als Funktion der Detergens-Konzentration c_{SDS} . Die Denaturierungskurven wurden mittels der AREX-Spektren in Abbildung 4.20 berechnet. Der CA-Effekt von Amid-Protonen (rote Linie) konnte dabei mit Hilfe der Drei-Punkt-Methode (Unterabschnitt 3.3.1) vom Untergrund der rNOE-Signale von aromatischen Protonen (violette Linie) separiert werden. Als Referenz wurde zusätzlich eine Fluoreszenz (FL)-Denaturierungskurve (schwarze Linie) aufgenommen. Anhand der aufgenommenen Daten kann die Denaturierung in drei verschiedene Phasen untergliedert werden (graue Flächen).

Zur übersichtlichen Darstellung der induzierten CEST-Signaländerungen unter Zugabe von SDS wurden die AREX-Denaturierungskurven bei diversen Frequenzoffsets $\Delta\omega$ berechnet (Abbildung 4.21). Dabei sind die folgenden CEST-Effekte untersucht worden: (i) rNOE aliphatischer Protonen ($\Delta\omega = -1,8$ ppm), (ii) rNOE aliphatischer Protonen bei der Resonanzfrequenz von SDS ($\Delta\omega = -3,6$ ppm), (iii) rNOE aromatischer Protonen (TPM,Ref bei $\Delta\omega = 3,5$ ppm) und (iv) CA von Amid-Protonen (TPM bei $\Delta\omega = 3,5$ ppm). Aufgrund desselben sigmoidalen Verlaufs der FL- und AREX-Denaturierungskurven von rNOE-Signalen aliphatischer und aromatischer Protonen kann auf eine eindeutige Korrelation der Sättigungstransfer-Effekte mit der Denaturierung des Lysats geschlossen werden. Die Signalabschwächung dieser rNOE-Signale von aliphatischen und aromatischen Protonen ist in Einklang mit der Signatur der Protein-Entfaltung und auch der Protein-Aggregation. Das Detergens SDS sollte unabhängig von der Molekülgröße zu einer Entfaltung aller Proteine im Lysat führen. In Übereinstimmung mit der Signatur der Protein-Entfaltung zeigte sich ein anfänglicher monotoner Anstieg des CA-Signals von Amid-Protonen als Funktion von c_{SDS} . Ab einer SDS-Konzentration von 16 mM nahm die Verstärkung des CA_{Amid} -Signals jedoch wieder ab. Der Signatur der Protein-Aggregation zu Folge kann dieser Rücklauf der Verstärkung von CA_{Amid} durch eine simultane Aggregation des Proteoms erklärt werden. Mittels Zentrifugation der denaturierten Lysate konnten allerdings keine unlöslichen Komponenten im unteren Teil der Modelllösung akkumuliert werden, welche auf eine Protein-Aggregation unter Zugabe von SDS hinweisen würden. Andere Mechanismen, die zu einer Abnahme der Verstärkung des CA_{Amid} -Signals als Funktion von c_{SDS} führen könnten, werden in Unterabschnitt 5.2.2 diskutiert. Die Ausbildung eines Plateaus der Denaturierungskurven ab einer Konzentration von ≈ 80 mM weist auf eine vollständige, mittels SDS mögliche, Denaturierung aller Proteine im Lysat hin.

4.4 CEST-Kontrast denaturierter Proteine

Die beobachteten Signaturen der Protein-Entfaltung und -Aggregation können dazu verwendet werden, einen MR-Kontrast zu entwickeln, welcher sehr sensitiv auf CEST-Signaländerungen von Proteinen unter Denaturierung reagiert.

4.4.1 Denatured Protein Contrast (DPC)

In diesem Kontext wird das Verhältnis aus einem isolierten CA- und rNOE-Signal von Proteinen als sog. *Denatured Protein Contrast* (DPC) definiert:

$$DPC = \frac{AREX_{CA}}{AREX_{rNOE}} \quad (4.1)$$

Unter der Annahme, dass die Signale $AREX_{CA}$ und $AREX_{rNOE}$ auf Protonen aus denselben Proteinen zurückgeführt werden können, ist dieser MR-Kontrast unabhängig von der Proteinkonzentration f_s (Gleichung 2.69). Somit entspricht DPC in erster Linie dem Verhältnis der mittleren Anzahl an Protonen pro Protein, welche mittels CEST als $AREX_{CA}$ bzw. $AREX_{rNOE}$ detektiert werden können. Aufgrund der Abhängigkeit dieses Verhältnisses vom globalen Faltungszustand des Proteoms (Unterabschnitt 4.1.3) ist DPC eine Funktion der Protein-Denaturierung. Unter Protein-Entfaltung ist dabei ein starker Anstieg des DPC zu beobachten (Abbildung 4.22). Die Zunahme von DPC unter Protein-Aggregation ist hingegen aufgrund der Abschwächung der CA-Signale weniger ausgeprägt. Der Einfluss anderer physiologischer Parameter, wie des pH-Werts, auf diesen MR-Kontrast wird in Unterabschnitt 5.2.3 diskutiert.

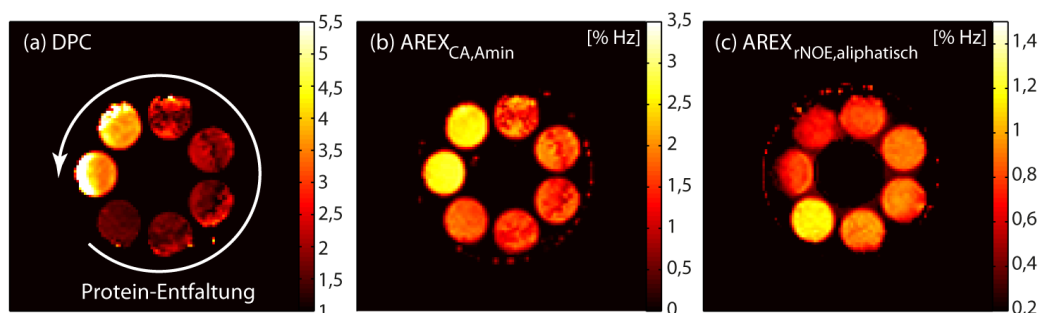


Abbildung 4.22: (a) Denatured Protein Contrast (DPC) unter Entfaltung von BSA mittels SDS. Der Kontrast wurde anhand des CA-Signals von Amin-Protonen (b) und des rNOE-Signals von aliphatischen Protonen (c) berechnet. Die Inhaltsstoffe in den Modelllösungen, Messparameter und Evaluierungsverfahren finden sich unter Abbildung 4.7. Die Abbildung wurde veröffentlicht in (Goerke u. a., 2015a).

4.4.2 Applikation *in vivo*

Die Wertigkeit des MR-Kontrasts DPC wurde in Aufnahmen von Patienten mit neu-diagnostizierten Glioblastomen untersucht. Wie in Abschnitt 4.3 gezeigt kann *in vivo* das rNOE-Signal aliphatischer und aromatischer Protonen, sowie das CA-Signal von Amid-Protonen für die selektive Detektion von Proteinen verwendet werden. Aufgrund der spektralen Isolation der rNOE-Signale von aliphatischen Protonen im Z-Spektrum wurde für die Berechnung des DPC das AREX-Signal bei $\Delta\omega = -3,5$ ppm verwendet:

$$AREX_{rNOE} = AREX(-3,5 \text{ ppm}) \quad (4.2)$$

Eine Separation des CA_{Amid} -Signals vom Untergrund der rNOE-Signale aromatischer Protonen war *in vivo* jedoch nur mit Hilfe der afAREX-Methode (Unterabschnitt 3.3.4) möglich. Grund hierfür ist die geringe spektrale Auflösung der Z-Spektren von lebendem Gewebe bei Messungen an einem Ganzkörper-MR-Tomographen. Unter Annahme eines konstanten Verhältnisses r_{rNOE} (Gleichung 3.13) zwischen rNOE-Signalen aromatischer und aliphatischer Protonen bei $\Delta\omega = 3,5$ ppm ergab sich das isolierte CA-Signal von Amid-Protonen zu (Gleichung 3.14):

$$AREX_{CA} = afAREX_{CA,Amid} = AREX(3,5 \text{ ppm}) - r_{rNOE} \cdot AREX(-3,5 \text{ ppm}) \quad (4.3)$$

Der *in vivo* DPC konnte somit unter Verwendung der beiden AREX-Signale bei $\Delta\omega = -3,5$ und $+3,5$ ppm berechnet werden:

$$DPC = \frac{AREX(3,5 \text{ ppm}) - r_{rNOE} \cdot AREX(-3,5 \text{ ppm})}{AREX(-3,5 \text{ ppm})} \quad (4.4)$$

Zur Abschätzung des Faktors r_{rNOE} im Gehirngewebe des Menschen wurde dieser im 14-T-NMR-Spektrometer für verschiedene Modellsysteme bestimmt (Abbildung 4.23). Dabei konnte $r_{rNOE} = 0,81$ in BSA-Modelllösungen bestimmt werden. Im heterogenen Gemisch von Proteinen (Hefezellen-Lysat) wurde $r_{rNOE} = 0,56$ gemessen. An homogenisiertem Gehirngewebe von Mäusen bzw. Schweinen wurde $r_{rNOE} = 0,21$ bzw. $0,12$ ermittelt. Die Variation von r_{rNOE} in den verschiedenen Modellsystemen ist wahrscheinlich eine Folge der veränderten Zusammensetzungen des jeweiligen Proteoms. Im Gehirngewebe kann somit auf eine kleinere Anzahl an aromatischen Aminosäuren im Vergleich zu BSA und Hefezellen-Lysaten geschlossen werden. Zur Berechnung des DPC im menschlichen Gehirngewebe wurde ein r_{rNOE} von $0,2$ angenommen. Dabei spielte die genaue Kenntnis des Faktors r_{rNOE} keine wesentliche Rolle, da der *in vivo* DPC bei kleinen Änderungen um $\Delta r_{rNOE} \approx \pm 0,1$ nur geringfügig variierte.

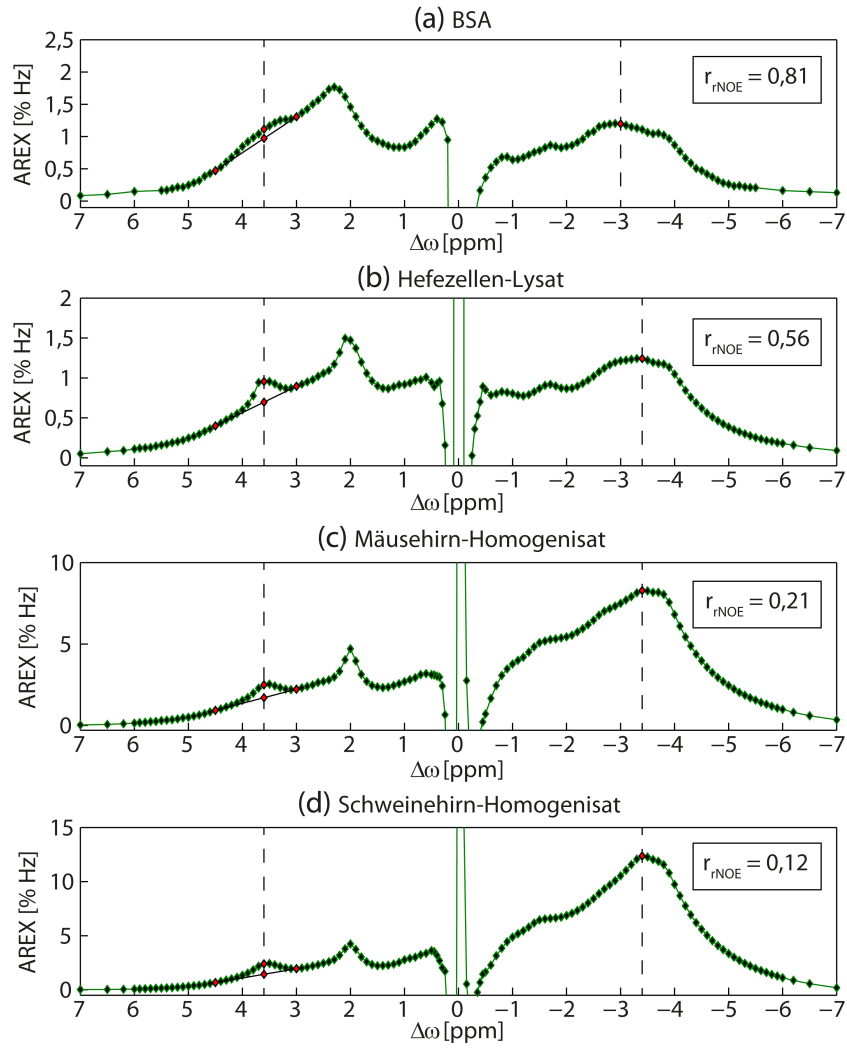


Abbildung 4.23: Das Verhältnis r_{rNOE} (Gleichung 3.13) von rNOE-Signalen aromatischer und aliphatischer Protonen in (a) BSA, (b) im Hefezellen-Lysat, (c) im Mäusehirn-Homogenisat und (d) im Schweinehirn-Homogenisat bei $pH = 7$ und $T = 37^\circ\text{C}$. rNOE-Signale aromatischer Protonen wurden mit Hilfe der Drei-Punkt-Methode (Unterabschnitt 3.3.1) separiert. Die gestrichelten Linien markieren die Frequenzoffsets $\Delta\omega$ zur Berechnung von $r_{\text{rNOE}} = \text{AREX}_{\text{TPM,Ref}}(+\Delta\omega) / \text{AREX}(-\Delta\omega)$. Die AREX-Spektren wurden mit $B_1 = 0,75 \mu\text{T}$ und (a) $t_{\text{sat}} = 12\text{s}$, (b) 14s , (c) $3,75\text{s}$ und (d) 12s aufgenommen. Die T_1 -Relaxationszeiten der Wasserprotonen betrugen (a) $3,74\text{s}$, (b) $2,83\text{s}$, (c) $2,61\text{s}$ und (d) $2,45\text{s}$.

Zur Bewertung des DPC in Glioblastom-Patienten wurden zusätzlich T_1 -gewichtete MR-Bilder unter Kontrastmittelgabe (T_1 -KM) aufgenommen. Aufgrund der geschädigten Blut-Hirn-Schranke in Glioblastomen und der damit einhergehenden Anreicherung des Kontrastmittels im Tumor, können Tumor-Areale durch eine hohe Intensität in den T_1 -KM Aufnahmen identifiziert werden. Hypointense Bereiche innerhalb der Tumoren werden als nekrotisches Gewebe identi-

ziert. Im umliegenden gesunden Gehirngewebe ist zusätzlich ein Kontrastunterschied zwischen weißer und grauer Hirnsubstanz erkennbar. Die großflächigen hypointensen Bereiche stellen Gehirnflüssigkeit (Liquor) dar. Der berechnete DPC in Glioblastom-Patienten weist eine starke Korrelation mit diesen T_1 -KM Aufnahmen auf (Abbildung 4.24). Im Vergleich zu den CEST-Kontrasten $AREX (\pm 3,5 \text{ ppm})$ trat dabei nur in den Bereichen der Tumor-Areale eine Signal-erhöhung auf. Darüber hinaus konnte durch die Berechnung des Verhältnisses zweier $AREX$ -Kontraste wie erwartet der Kontrast zwischen grauer und weißer Hirnsubstanz annähernd ausgeglichen werden. Dies ermöglichte eine klare Abgrenzung der Tumor-Areale vom umliegenden gesunden Gehirngewebe mittels CEST-Bildgebung. Im Unterschied zu den T_1 -KM Aufnahmen wird für die Detektion der CEST-Effekte kein Kontrastmittel benötigt.

Abschließend sei auf ein diffuses Signal des DPC am Rand der Tumoren hingewiesen (weiße Pfeile in Abbildung 4.24), welches in den T_1 -KM Aufnahmen nicht erkennbar ist. Ob dieses mit dem Verlauf des Tumorwachstums korreliert, muss in weiteren Studien geklärt werden. Inwieweit der *in vivo* DPC auf eine Denaturierung des Proteoms zurückgeführt werden kann, wird im anschließenden Kapitel diskutiert (Abschnitt 5.2).

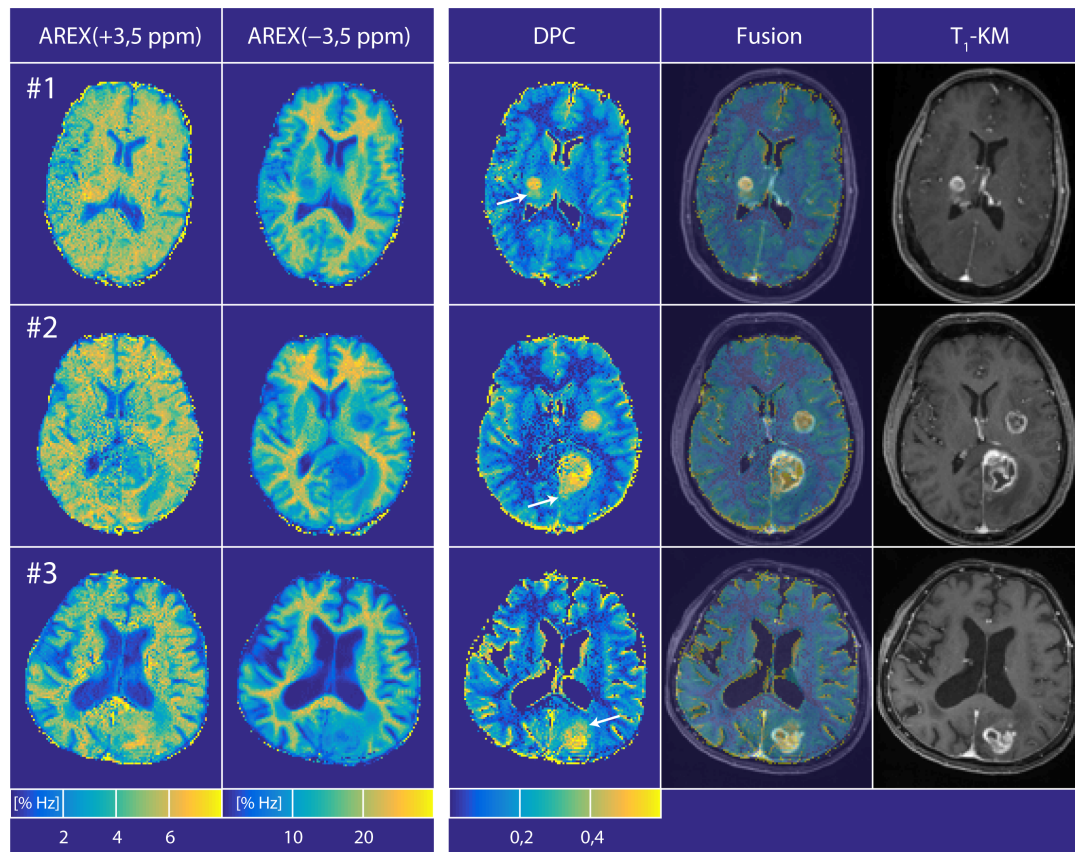


Abbildung 4.24: *Denatured Protein Contrast* (DPC) neu-diagnostizierter und histologisch gesicherter Glioblastome. Die Patienten (#1 - #3) wurden aus einer Studie mit insgesamt 12 Patienten ausgewählt (Zaiss u. a., 2015a). Die AREX-Signale ($B_{1,mean} = 0,6 \mu\text{T}$, $t_{sat} = 3,75 \text{ s}$) wurden mit Hilfe eines Multi-Lorentz-Fit von DS und ssMT separiert. Für die Berechnung des DPC mit Gleichung 4.4 wurde ein Verhältnis von $r_{rNOE} = 0,2$ angenommen. Dabei wurden nur Pixel mit $AREX(-3,5 \text{ ppm}) > 2 \%$ dargestellt. Die mittlere T_1 -Relaxationszeit des Wassersignals im Gehirngewebe betrug ca. 1,3 s.

5 Diskussion

Die globale Denaturierung des Proteoms eines Organismus ist ein Anzeichen für übermäßige Belastungen, Erkrankung oder Alterung. Ein CEST-Kontrast mit dem Potential, eine Denaturierung von Proteinen *in vivo* zu detektieren, wäre somit von besonderer Bedeutung für die Diagnostik von diversen Pathologien. Unser bisheriger Ansatz aus dem Jahre 2013, die Protein-Denaturierung mittels CEST zu detektieren, basierte auf dem rNOE-Signal aliphatischer Protonen im Bereich negativer Frequenzoffsets im Z-Spektrum ($\Delta\omega < 0$ ppm) (Zaiss u. a., 2013). Die eindeutige Identifikation einer globalen Denaturierung *in vivo* mit Hilfe der Signaländerung eines einzelnen CEST-Effekts ist jedoch aufgrund der simultanen Abhängigkeit von der Protein-Konzentration nicht möglich. In der vorliegenden Arbeit werden daher zusätzlich die rNOE- und CA-Signale von Proteinen im positiven Frequenzbereich des Z-Spektrums ($\Delta\omega > 0$ ppm) in die Detektion der Protein-Denaturierung miteinbezogen.

5.1 Einfluss der Denaturierung auf die CEST-Effekte von Proteinen

Die Verwendung einer kleinen RF-Amplitude $B_1 < 1 \mu\text{T}$, sowie einer hohen Feldstärke des statischen Grundmagnetfelds von $B_0 = 14,1 \text{ T}$ ermöglichte die Detektion von Z-Spektren mit einer hohen spektralen Auflösung. Somit können diverse CA- und rNOE-Signale von Proteinen simultan untersucht werden.

5.1.1 Isolierte Sättigungstransfer-Effekte

Eine Separation isolierter CEST-Effekte, die frei sind von Einflüssen der direkten Wassersättigung, des ssMT, sowie der T_1 -Relaxation des Wassersignals, ist unter Verwendung der AREX-Auswertemethode von Z-Spektren (Unterabschnitt 3.3.1) möglich. Für CEST-Effekte chemisch austauschender Protonen (CA-Signale) wurde die Berechnung isolierter Sättigungstransfer-Effekte mittels AREX bereits in verschiedenen Studien bestätigt (Zaiss u. a., 2014, 2015b; Goerke u. a., 2014, 2015a). Für rNOE-Signale (Unterabschnitt 2.2.3) kann jedoch die Korrektur einer veränderten T_1 -Relaxation des Wassersignals aufgrund einer intrinsischen Abhängigkeit der Relaxationszeiten von dipolaren Wechselwirkungen (Solomon, 1955; Mangia u. a., 2009) nicht ohne weiteres angenommen werden. Die korrekte Berechnung isolierter rNOE-Signale mittels der AREX-Methode konnte allerdings durch eine T_1 -Unabhängigkeit der rNOE-Signale aliphatischer und aromatischer Protonen in BSA (Abbildung 4.1) erstmalig im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Die Korrektur des ssMT für rNOE-Signale unterscheidet sich hingegen prinzipiell nicht von der eines CA-Signals, weshalb im Folgenden die Funktionalität der AREX-Methode für rNOE-Signale in Anwesenheit eines ssMT ohne experimentelle Überprüfung angenommen wird. Die AREX-Methode ermöglicht somit eine quantitative Untersuchung isolierter CA- und rNOE-Signale von Proteinen unter Denaturierung.

5.1.2 Signatur der Protein-Entfaltung

Unter Protein-Entfaltung wird eine Abschwächung der rNOE-Signale, sowie eine Verstärkung der CA-Signale von Proteinen beobachtet. Diese charakteristischen CEST-Signaländerungen sind in der Signatur der Protein-Entfaltung zusammengefasst (Abbildung 4.7) (Goerke u. a., 2015a). Auf eine eindeutige Korrelation der CEST-Signaländerungen mit der Proteinstruktur kann aufgrund desselben sigmoidalen Verlaufs der AREX- und FL-Denaturierungskurven geschlossen werden (Abbildung 4.3). Die Verwendung der AREX-Methode erübrigte dabei eine aufwendige Nachbearbeitung der CEST-Signale (Zaiss u. a., 2013) für einen quantitativen Vergleich mit der FL-Denaturierungskurve (Abbildung 4.4).

Zur Untersuchung des Einflusses der Entfaltung auf die CEST-Effekte von Proteinen wurde BSA mit Hilfe des Detergens SDS denaturiert. Gegenüber der Verwendung von Urea zur Entfaltung von BSA (Zaiss u. a., 2013) ermöglicht SDS die Analyse von Signaländerungen über den kompletten Frequenzbereich endogener CEST-Effekte, ohne Störung durch überlappende Signale des Detergens (Abbildung 4.2). Somit können zusätzlich zu den rNOE-Signalen von aliphatischen Protonen ($\Delta\omega < 0$ ppm), rNOE- und CA-Signale im Bereich positiver Frequenzoffsets ($\Delta\omega > 0$ ppm) unter Entfaltung analysiert werden. Die Entfaltung von BSA mit Hilfe von SDS ist zeitgleich in einer anderen Studie mittels CEST untersucht worden (Longo u. a., 2014). Dabei wurde in Einklang mit den Ergebnissen in dieser Arbeit ein Anstieg des CA-Signals von Amin-Protonen unter Protein-Entfaltung beobachtet. Aufgrund der Verwendung einer vergleichsweise großen RF-Amplitude $B_1 = 6 \mu\text{T}$, sowie der Asymmetrie-Analyse von Z-Spektren (MTR_{asym} (Zhou u. a., 2003)), welche die CEST-Effekte im Bereich positiver und negativer Frequenzoffsets vermischt, konnten jedoch keine weiteren CEST-Signale von BSA detektiert werden. Mit Hilfe der verwendeten Lorentz-Fit-Analyse von Z-Spektren in der vorliegenden Arbeit (Unterabschnitt 3.3.1) ist hingegen die Berechnung einer individuellen AREX-Denaturierungskurve bei jedem einzelnen Frequenzoffset möglich.

Dabei ist ähnlich wie für rNOE-Signale aliphatischer Protonen ($\Delta\omega = -1,8$ und $-3,2$ ppm) eine Abschwächung der AREX-Denaturierungskurven bei den Frequenzoffsets chemisch austauschender Amid-Protonen ($\Delta\omega = 3,5$ ppm) und Guanidinium-Protonen ($\Delta\omega = 2,0$ ppm) beobachtbar. Dies ist ein starker Hinweis auf die Existenz überlappender rNOE-Signale im Bereich positiver Frequenzoffsets, welche höchstwahrscheinlich von aromatischen Protonen herühren. Anzeichen für rNOE-Signale aromatischer Protonen wurden bereits von (Jin und Kim, 2013) berichtet. Das Auftreten rNOE-Signalen aromatischer Protonen im Bereich positiver Frequenzoffsets konnte allerdings zum ersten Mal im Rahmen dieser Arbeit bewiesen werden (Abbildung 4.6). Hierfür wurde die WEX-Spektroskopie (Unterabschnitt 3.2.4) verwendet. Eine eindeutige Trennung von rNOE- und CA-Signalen war mit Hilfe einer Variation des pH-Werts möglich. Dabei wurde eine mittlere effektive Magnetisierungstransfer-Rate der beobachteten rNOE-Signale zum Wasser-Pool von $k_{sw} = (2,69 \pm 0,46)$ Hz gemessen. Diese stimmt sehr gut mit einer Abschätzung für die effektive Austauschrate der rNOE-Signale aliphatischer Protonen von 2 – 5 Hz (Friedman u. a., 2015) überein. Die Berücksichtigung der rNOE-Signale aromatischer Protonen ist ausschlaggebend für die korrekte Interpretation der beobachteten CEST-Signaländerungen unter Denaturierung in allen verwendeten Modellsystemen in dieser Arbeit. Mit Hilfe einer Separation der CA-Signale vom Untergrund der rNOE-Signale aromatischer Protonen kann somit, in Einklang mit der Signatur der Protein-Entfaltung, ebenfalls eine Verstärkung der CEST-Effekte von Amid- und Guanidinium-Protonen in BSA unter Entfaltung

beobachtet werden (Abbildung 4.5). Das Auftreten von rNOE-Signalen aromatischer Protonen konnte darüber hinaus in Hefezellen-Lysaten bestätigt werden (Abbildung 4.17).

5.1.3 Signatur der Protein-Aggregation

Unter Protein-Aggregation wird eine simultane Abschwächung der rNOE- und CA-Signale von Proteinen beobachtet. Diese charakteristischen CEST-Signaländerungen sind in der Signatur der Protein-Aggregation zusammengefasst (Unterabschnitt 4.2.2). Aufgrund der gegenläufigen Tendenz der CA-Signale unter Protein-Entfaltung und -Aggregation ist somit prinzipiell eine Unterscheidung dieser beiden Vorgänge mittels CEST möglich. Die Signatur der Protein-Aggregation wurde mit Hilfe zwei verschiedener Protein-Isoformen untersucht: HTT-Proteine (Abbildung 4.11) und β -Amyloide (Abbildung 4.12). Eine Aggregat-Bildung dieser beiden Proteine ist aus diversen Studien zur Erforschung neurodegenerative Erkrankungen bekannt (Ross und Poirier, 2004). Aufgrund des aufwendigen Verfahrens zur Aufreinigung dieser beiden Proteine konnten für diese Arbeit lediglich Modelllösungen mit einer Konzentration von einigen $10\mu\text{M}$ hergestellt werden. Bemerkenswerterweise können selbst bei derartig geringen Konzentrationen individuelle Resonanzen von Proteinen mittels CEST aufgelöst werden. Dabei ist im Gegensatz zu BSA ein ausgeprägtes CA-Signal von Amid-Protonen ($\Delta\omega = 3,6\text{ppm}$) in HTT-Proteinen und β -Amyloiden detektierbar. Eine wichtige Beobachtung ist, dass auch nach Beendigung des Aggregationsprozesses residuale CEST-Signale vorhanden sind (Abbildung 4.14). Diese residualen Signale, mit Intensitäten von $\approx 30\%$ der anfänglichen Signalstärke im nativen Faltungszustand, können prinzipiell zur Detektion einer Anreicherung dieser Proteine im menschlichen Gehirn und somit möglicherweise zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen (z.B. Morbus Alzheimer, Chorea Huntington, Prionen-Erkrankungen, etc.) verwendet werden. Ob die Konzentrationen an akkumulierten Proteinen für eine Detektion *in vivo* ausreichen, muss in weiteren Studien geklärt werden.

Betrachtet man die rNOE-Signale von Proteinen unter Entfaltung und Aggregation, so kann verallgemeinernd auf eine Abnahme dieser Signale unter Denaturierung geschlossen werden. Somit findet der effektivste Magnetisierungstransfer von fest gebundenen aliphatischen und aromatischen Protonen zum Wasser-Pool erstaunlicherweise bei der nativen Faltungskonfiguration von Proteinen statt. Welche molekularen Mechanismen für die beobachteten Änderungen der CEST-Signale unter Protein-Denaturierung verantwortlich sind, wird im nachfolgenden Unterabschnitt erläutert.

5.1.4 Ursprung der CEST-Signaländerungen unter Denaturierung

Die Abhängigkeit eines isolierten CEST-Effekts (CA oder rNOE) von der effektiven Magnetisierungstransfer-Rate k_{sw} zum Wasser-Pool, dem Protonen-Verhältnis f_s , sowie der Sättigungseffizienz α wird durch nachfolgende Gleichung beschrieben (Gleichung 3.9):

$$AREX = f_s k_{sw} \frac{(\gamma B_1)^2}{\underbrace{(\gamma B_1)^2 + k_{sw}(k_{sw} + R_{2s})}_{=\alpha(B_1)}} \quad (5.1)$$

wobei R_{2s} der transversalen Relaxationsrate des CEST-Pools entspricht. Dabei stellt sich die Frage, inwiefern die beobachteten Signaländerungen unter Protein-Entfaltung bzw. -Aggregation auf die einzelnen Parameter (k_{sw} , f_s und R_{2s}) zurückgeführt werden können.

Protein-Entfaltung

Die Signatur der Protein-Entfaltung wird im Wesentlichen durch Änderungen in f_s hervorgerufen. Dabei wird ein Anstieg von f_s für CA-Signale (Abbildung 4.8) und eine Abschwächung von f_s für rNOE-Signale (Abbildung 4.9) beobachtet. Bemerkenswerterweise sind unter Protein-Entfaltung allerdings keine signifikanten Änderungen der effektiven Magnetisierungstransfer-Raten k_{sw} detektierbar. Zusätzlich kann der Einfluss veränderter Relaxationsraten R_{2s} vernachlässigt werden, worauf im Folgenden genauer eingegangen wird. Aufgrund der Abhängigkeit des Parameters f_s vom Faltungszustand der Proteine kann dieser im Kontext der Protein-Denaturierung nicht als Verhältnis der Protonen-Konzentrationen (Gleichung 2.44) interpretiert werden. Da sich die Anzahl an Protonen in den Proteinen durch eine Entfaltung nicht ändert, entspricht f_s vielmehr dem Verhältnis an Protonen, welche mittels CEST detektierbar sind.

Zur Untersuchung des Ursprungs der Signaländerungen von CA-Effekten unter Protein-Entfaltung wurde die Resonanz von Amin-Protonen in BSA verwendet. Dabei können Änderungen von R_{2s} aufgrund einer vergleichsweise großen Austauschrate dieser Protonen ($k_{sw} \gg R_{2s} \approx 50 \text{ Hz}$ (Sun u. a., 2007a)) vernachlässigt werden (Abbildung 2.13). In diesem Fall können die Parameter k_{sw} und f_s mit Hilfe einer Erweiterung der Ω -Plot-Methode (Unterabschnitt 3.3.3) quantitativ bestimmt werden. Diese ermöglicht eine separate Analyse von Änderungen in k_{sw} und f_s unter Protein-Entfaltung. Die dabei beobachtete Unabhängigkeit der Austauschrate k_{sw} vom Protein-Faltungszustand scheint auf den ersten Blick in Widerspruch mit anderen Studien zu stehen: üblicherweise wird angenommen, dass Austauschraten von chemisch austauschenden Protonen um mehrere Größenordnungen verringert werden, wenn diese im Inneren von Proteinen eingebettet oder in Wasserstoffbrücken gebunden sind (Mori u. a., 1997; Skinner u. a., 2012a,b). Unter Protein-Entfaltung treten Konformationsänderungen auf, welche von einer Auflösung struktureller Wasserstoffbrückenbindungen begleitet werden. Zusätzlich werden innen liegende Aminosäurereste freigelegt, wodurch ein direkter Kontakt zum umliegenden Wasser entsteht. Durch den sprunghaften Anstieg der Austauschraten dieser Protonen unter Protein-Entfaltung werden diese mittels CEST abrupt detektierbar. Eine Zunahme der mittels CEST detektierbaren Protonen tritt mit Hilfe der verwendeten Ω -Plot-Methode durch eine Verstärkung von f_s in Erscheinung. Somit sind die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit in Einklang mit der üblichen Vorstellung über die molekularen Mechanismen von chemisch austauschenden Protonen unter Protein-Entfaltung. Gleichmaßen ist ein künstlicher Anstieg von f_s durch die beobachtete Abnahme der Dispersion der chemischen Verschiebung möglich.

Zur Untersuchung des Ursprungs der Signaländerungen von rNOE-Signalen unter Protein-Entfaltung wurden die Resonanzen von aliphatischen und aromatischen Protonen in BSA verwendet. Dabei können Änderungen von R_{2s} unter Protein-Entfaltung aufgrund der Detektion unveränderter Linienbreiten (Gleichung 2.52) von rNOE-Signalen vernachlässigt werden (Abbildung 4.2). Die Protein-Entfaltung hätte außerdem eine Abnahme der Korrelationszeiten τ_c von in Proteinen gebundenen Protonen zur Folge, wodurch eine Abnahme von R_{2s} zu erwarten wäre (Solomon, 1955; Neuhaus und Williamson, 1989; Mangia u. a., 2009). Da eine Abschwächung von R_{2s} nach obiger Gleichung 5.1 allerdings eine Verstärkung der rNOE-Signale bedeuten würde, kann eine Änderung von R_{2s} als Ursache der beobachteten CEST-Signaländerungen von rNOE-Signalen unter Protein-Entfaltung ausgeschlossen werden. Eine Quantifizierung der Parameter k_{sw} und f_s für rNOE-Signale ist mit Hilfe der WEX-Spektroskopie möglich (Unterabschnitt 3.3.5). In Analogie zur Ω -Plot-Methode sind dabei WEX-Signale, deren effekti-

ve Magnetisierungstransfer-Raten k_{sw} um mehrere Größenordnungen verringert werden, nicht mehr detektierbar. Außerdem tritt eine Abnahme der mittels WEX-Spektroskopie detektierbaren Protonen auch durch eine Verminderung von f_s in Erscheinung. Unter Protein-Entfaltung werden zuvor benachbarte Aminosäurereste räumlich voneinander getrennt. Zusätzlich werden strukturelevante Wassermoleküle im Inneren der Proteine herausgelöst (Zaiss u. a., 2013). Infolgedessen werden intra-molekulare Spin-Diffusion-Prozesse (Unterabschnitt 2.2.2) aufgrund der starken Abhängigkeit von den Wechselwirkungsabständen der Kernspins $\sim 1/r^6$ (Gleichung 2.34) sprunghaft verringert. Somit kann die beobachtete Abschwächung von rNOE-Signalen unter Protein-Entfaltung auf eine Abnahme der Anzahl von fest gebundenen Protonen, die mittels eines Magnetisierungstransfer-Pfades zum Wasser-Pool verknüpft sind, zurückgeführt werden.

Protein-Aggregation

Im Unterschied zur Protein-Entfaltung ist eine genaue Aufschlüsselung des Ursprungs der beobachteten Signaländerungen im Fall der Protein-Aggregation nicht möglich. Grund hierfür ist die nicht vernachlässigbare Änderung der Relaxationsrate R_{2s} bei diesem Prozess. Die Immobilisierung von Proteinen durch die Ausbildung rigider makromolekularer Strukturen hat eine starke Verlängerung der Korrelationszeiten τ_c von in Proteinen gebundenen Protonen zur Folge. Daraus resultiert eine Zunahme von R_{2s} (Solomon, 1955; Neuhaus und Williamson, 1989; Mangia u. a., 2009), wodurch wiederum eine Abschwächung aller auftretenden CEST-Signale hervorgerufen wird (Gleichung 5.1). Diese Abschwächung der rNOE- und CA-Signale von Proteinen ist in Einklang mit der detektierten Signatur der Protein-Aggregation (Abschnitt 4.2). Somit ist prinzipiell eine Abhängigkeit der CEST-Signaländerungen von den Parametern k_{sw} , f_s , sowie R_{2s} möglich. Eine simultane Quantifizierung von drei verschiedenen Parametern kann jedoch mit den zuvor verwendeten Methoden im Fall der Protein-Entfaltung nicht realisiert werden. In weiterführenden Studien könnte allerdings ein numerischer Fit der Bloch-McConnell-Gleichungen (Gleichungen 2.36 - 2.41) dazu verwendet werden, den Ursprung der beobachteten Signaländerungen unter Protein-Aggregation zu ergründen.

Auf einer molekularen Ebene entspricht der Aggregationsprozess prinzipiell dem Gegenteil einer Protein-Entfaltung: Durch das Zusammenklumpen diverser Proteine wird ein gewisser Anteil der Aminosäurereste mit direktem Kontakt zum umliegenden Wasser im Inneren der makromolekularen Aggregate verborgen oder in Wasserstoffbrücken gebunden. Die dadurch hervorgerufene Abnahme der Anzahl detektierbarer chemisch austauschender Protonen ist in Einklang mit der Signatur der Protein-Aggregation. Außerdem werden intra-molekulare Spin-Diffusion-Prozesse durch verringerte Wechselwirkungsabstände der Kernspins begünstigt, wodurch eine Signalerhöhung von rNOE-Signalen hervorgerufen werden würde. Diese hypothetisch erwartete Signalzunahme steht im Kontrast zur Signatur der Protein-Aggregation. Ob dieser molekulare Mechanismus möglicherweise von einer dominanten Signalabschwächung durch eine Zunahme von R_{2s} überdeckt wird, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

5.2 CEST-Kontrast denaturierter Proteine *in vivo*

5.2.1 Detektion von Protein *in vivo*

Bei CEST-Experimenten an lebendem Gewebe kommt es zu einer Überlagerung diverser Signale unterschiedlicher intrazellulärer Komponenten, wie z.B. Proteinen und anderen Makromolekülen oder Metaboliten (Unterabschnitt 2.3.2). Eine selektive Detektion der Gesamtheit aller Proteine in einem Proteom ist jedoch unter Verwendung folgender CEST-Effekte möglich:

- (i) CA von Amid-Protonen ($\Delta\omega \approx 3,5$ ppm)
- (ii) rNOE von aliphatischen ($\Delta\omega < 0$ ppm) und aromatischen ($\Delta\omega > 0$ ppm) Protonen

Grund hierfür ist die eindeutige Zuordnung von chemisch austauschenden Protonen mit einer Resonanzfrequenz von $\Delta\omega \approx 3,5$ ppm zu Amid-Protonen in Peptid-Bindungen (Zhou u. a., 2003). Dabei kann der Beitrag von Dipeptiden oder anderen kleinen Molekülen mit Peptid-Bindungen gegenüber der Konzentration intrazellulärer Proteine vernachlässigt werden. Außerdem ist das Auftreten eines rNOE-Magnetisierungstransfers aufgrund einer abnehmenden Effizienz von intra-molekularen Spin-Diffusion-Prozessen mit schnelleren molekularen Bewegungen auf Makromoleküle beschränkt (Unterabschnitt 2.2.2). Neben gelösten Proteinen sind jedoch in einem lebenden Organismen diverse andere in Zellen und Zellorganellen eingebundene Makromoleküle (Proteine, Polysaccharide und Lipide) vorhanden. Der Anteil dieser Makromoleküle am Gesamtsignal der rNOE-Signale kann mit Hilfe eines Zellaufschlusses und einer anschließenden Auftrennung der Zellbestandteile abgeschätzt werden. Für diese Experimente wurden Hefezellen verwendet, wobei insgesamt drei verschiedene Kompartimente unterschiedlicher Viskosität und Löslichkeit beobachtet wurden (Tabelle 4.1). Eine individuelle Messung der einzelnen Kompartimente ergab einen mittleren CEST-Signalanteil von in Zellorganellen eingebundenen Makromolekülen von $\approx 30\%$ (Abbildung 4.16). Aufgrund der vergleichsweise voluminösen Zellwand von Hefezellen kann in menschlichen Zellen mit einem tendenziell kleineren Signalanteil gerechnet werden. Somit können rNOE-Signale von aliphatischen und aromatischen Protonen hauptsächlich auf den löslichen Teil des Proteoms zurückgeführt werden. Mit Hilfe der aufgelisteten CEST-Effekte von Proteinen ist daher prinzipiell die Detektion einer globalen Protein-Denaturierung *in vivo* möglich.

In reinen Proteinlösungen sind neben dem CA-Signal von Amid-Protonen außerdem die CEST-Effekte von chemisch austauschenden Amin- bzw. Guanidinium-Protonen bei $\Delta\omega \approx 2,7$ bzw. $2,0$ ppm beobachtbar (Abbildung 4.5 und 4.13). Bei Messungen in lebendem Gewebe werden diese allerdings von den CA-Signalen der Metaboliten Glutamat ($\Delta\omega \approx 2,7$ ppm) (Haris u. a., 2013; Cai u. a., 2012; Jin u. a., 2012) und Kreatin ($\Delta\omega \approx 2,0$ ppm) (Haris u. a., 2012; Goerke u. a., 2014) überlagert. Somit ist eine selektive Detektion von Proteinen mittels dieser CA-Signale nicht möglich.

5.2.2 Denaturierung von Hefezellen-Lysaten

In Annäherung an das komplexe Zusammenspiel von Proteinen in einem lebenden Organismus kann die Denaturierung eines heterogen zusammengesetzten Gemischs von Proteinen untersucht werden. Hierfür eignet sich das Lysat von Hefezellen, da dieses in ausreichend großen Mengen für CEST-Experimente (mehrere ml) hergestellt werden kann. Der im Rahmen dieser

Arbeit optimierte Lyse-Vorgang (Unterabschnitt 3.5.4) ermöglicht zudem eine gute Vergleichbarkeit der Lysate aus unterschiedlichen Herstellungszyklen.

Mittels CEST ist die Detektion einer globalen Protein-Denaturierung des gesamten Proteoms im Lysat möglich. Hierfür können die rNOE-Signale von aliphatischen und aromatischen Protonen verwendet werden. In Einklang mit der Signatur der Protein-Entfaltung und -Aggregation kann eine Abnahme dieser rNOE-Signale unter Hitzeschock (Abbildung 4.18), sowie unter Zugabe von SDS (Abbildung 4.20) beobachtet werden. Die Ausbildung von Aggregaten unter Hitzeschock wurde mit Hilfe einer Zentrifugation überprüft (Abbildung 4.19). Auf eine Korrelation der CEST-Signaländerungen mit der globalen Entfaltung des Proteoms im Lysat kann aufgrund desselben sigmoidalen Verlaufs der AREX- und FL-Denaturierungskurven als Funktion der SDS-Konzentration geschlossen werden (Abbildung 4.21). Die detektierten Denaturierungskurven im Lysat entsprechen dabei einer Überlagerung von Signalen diverser Proteine mit unterschiedlichen Molekülgrößen, sowie verschiedener Zusammensetzungen von Aminosäuren. Eine Abweichung der prozentualen Abnahme der AREX- und FL-Denaturierungskurven kann somit auf das unregelmäßige Vorkommen der Aminosäure Tryptophan in unterschiedlichen Proteinen zurückgeführt werden. Tryptophan ist verantwortlich für das detektierte FL-Signal (Abschnitt 3.4). Da Proteine allerdings unabhängig vom Vorkommen einer Tryptophan-Einheit zum CEST-Signal beitragen, kann es zu einer Diskrepanz zwischen den detektierten Signalen dieser beiden Methoden kommen.

Eine eindeutige Differenzierung zwischen Protein-Entfaltung und -Aggregation in Lysaten ist jedoch mit Hilfe der in dieser Arbeit verwendeten Denaturierungsexperimente nicht möglich. Grund hierfür ist eine nicht eindeutige Änderung des CA-Signals von Amid-Protonen unter Denaturierung. In Hitze-geschockten Lysaten wurde ein annähernd konstantes Signal dieser Protonen beobachtet (Abbildung 4.18). Um eine Aussage über den Ursprung dieser Konstanz treffen zu können, müsste ein Hitzeschock bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt werden. Unter Zugabe von SDS ist hingegen in Übereinstimmung mit der Signatur der Protein-Entfaltung eine anfängliche Verstärkung des Amid-Protonen-Signals detektierbar (Abbildung 4.21). Bei höheren SDS-Konzentrationen ist allerdings ein Rückgang dieser Verstärkung beobachtbar. Der Grund hierfür ist nicht bekannt; eine Abnahme der Verstärkung könnte jedoch durch eine Anlagerung vieler SDS-Moleküle an kleine Proteine erklärt werden. Eine Sättigung des Entfaltungsvorgangs tritt bei kleinen Proteinen bereits bei geringeren SDS-Konzentrationen ein als bei großen. Eine fortschreitende Anlagerung von SDS an bereits vollständig entfaltete Proteine könnte dabei den Kontakt von Amid-Protonen zum umliegenden Wasser-Pool unterbinden, wodurch diese mittels CEST nicht mehr detektierbar wären.

Der beobachtete Signalanstieg der rNOE-Signale aliphatischer Protonen unter Zugabe von SDS (Abbildung 4.20) kann auf eine starre Anbindung von SDS-Molekülen an bestimmte Proteine zurückgeführt werden. Dabei tritt eine Immobilisierung der SDS-Moleküle auf, wodurch inter-molekulare Spin-Diffusion-Prozesse mit den Proteinen begünstigt werden (Unterabschnitt 2.2.2). Infolgedessen können starr gebundene SDS-Moleküle indirekt über einen rNOE-Magnetisierungstransfer von Proteinen detektiert werden. Die spektrale Position ansteigender rNOE-Signale unter Zugabe von SDS stimmt mit den Frequenzoffsets aliphatischer Protonen in SDS überein. Die Möglichkeit zur Detektion einer Interaktion von verschiedenen Molekülen mittels CEST wurde bereits *in vitro* am Beispiel einer Anbindung von spezifischen Proteinen an Liposome gezeigt (Longo u. a., 2014). Mit Hilfe der verwendeten Methoden zur selektiven Detektion

von CEST-Signalen in dieser Arbeit können somit möglicherweise neue Einblicke in spezielle Bindungs-Mechanismen von Proteinen gewonnen werden.

CEST-Signaländerungen können außerdem hauptsächlich auf den löslichen Teil des Proteoms zurückgeführt werden. Ein Hitzeschock der übrigen Kompartimente der Zellen, welche bei der Herstellung von Lysaten abzentrifugiert werden, ergab einen Anteil der Gesamtänderung der rNOE-Signale von lediglich $\approx 20\%$ (Abbildung 4.18). Aufgrund der Unlöslichkeit dieser Komponenten kann eine Denaturierung mittels SDS nicht untersucht werden. CEST-Signaländerungen, welche überwiegend vom löslichen Teil des Proteoms hervorgerufen werden sind vielversprechend für die selektive Detektion einer globalen Protein-Denaturierung *in vivo*.

5.2.3 DPC von Hirntumoren

Mit Hilfe des *Denatured Protein Contrast* (DPC) ist die Detektion von Tumoren in Glioblastom-Patienten möglich (Abbildung 4.24). Im Unterschied zu den MR-Kontrasten isolierter CEST-Effekte, $AREX(\pm 3,5 \text{ ppm})$, tritt dabei bemerkenswerterweise eine Signalerhöhung lediglich im Bereich der Tumor-Areale auf, wodurch eine klare Abgrenzung vom umliegenden gesunden Gehirngewebe ermöglicht wird. Inwiefern die beobachtete Signalerhöhung des DPC auf eine globale Denaturierung des Proteoms zurückgeführt werden kann, wird im Folgenden erläutert. Der DPC ist definiert, als das Verhältnis aus einem isolierten CA- und rNOE-Signal von Proteinen (Gleichung 4.1):

$$DPC = \frac{AREX_{CA}}{AREX_{rNOE}} \quad (5.2)$$

Aufgrund einer einheitlichen Abschwächung von rNOE-Signalen unter Protein-Entfaltung und -Aggregation kann ein starker Anstieg des DPC mit einer fortschreitenden globalen Denaturierung des Proteoms beobachtet werden. Simultan ansteigende CA-Signale von Proteinen tragen zusätzlich zu einer Verstärkung des DPC im Fall einer überwiegenden Entfaltung bei (Abbildung 4.22). Eine globale Aggregation des Proteoms sollte hingegen zu einem weniger ausgeprägten Anstieg des DPC führen. Grund hierfür ist die parallele Abschwächung von CA-Signalen unter Protein-Aggregation. Somit ist ein stärkerer Kontrast von DPC unter Protein-Entfaltung gegenüber einer Aggregation zu erwarten.

Der DPC ist außerdem unabhängig von der Protein-Konzentration f_s . Grund hierfür ist die Proportionalität von AREX bezüglich der Konzentration (Gleichung 5.1), wodurch das Verhältnis zweier CEST-Signale unabhängig von f_s ist. Dabei wird angenommen, dass das verwendete CA- und rNOE-Signal auf Protonen aus denselben Proteinen zurückgeführt werden kann. Diese Annahme ist unter Verwendung des CA-Signals von Amid-Protonen aufgrund einer Lokalisation dieser Protonen im Protein-Rückgrat (Abbildung 2.16), sowie des rNOE-Signals von aliphatischen Protonen aufgrund des Vorkommens dieser Protonen in allen Aminosäuren (Abbildung 2.14) erfüllt. Eine veränderte Zusammensetzung des Proteoms in verschiedenen Gewebearten oder Pathologien könnte dabei allerdings fälschlicherweise als eine globale Denaturierung interpretiert werden. Je nach Vorkommen unterschiedlicher Größen an Proteinen ist ein unterschiedliches mittleres Verhältnis an Protonen, welche mittels CEST als CA- oder rNOE-Signal detektiert werden können, denkbar. Der Ausgleich des Kontrastes zwischen grauer und weißer Hirnsubstanz mit Hilfe des DPC ist jedoch ein starker Hinweis auf ein annähernd konstantes Verhältnis dieser Protonen im menschlichen Gehirn (Abbildung 4.24). Das Vorkommen hoher

Konzentrationen von Lipiden in den Myelinschichten der weißen Hirnsubstanz scheint dabei keinen Einfluss zu haben. Das Auftreten von CEST-Effekten in Lipiden steht derzeit unter Diskussion (Lu u. a., 2015). Inwiefern sich die Zusammensetzung des Proteoms von Glioblastomen gegenüber gesundem Gehirngewebe unterscheidet ist allerdings unklar. Eine kombinierte strukturelle Charakterisierung des Proteoms von biopsiertem Gewebe könnte jedoch diesen Sachverhalt klären.

Aufgrund des CA-Signals von Proteinen ist außerdem prinzipiell eine Abhängigkeit des DPC vom pH-Wert möglich. Diese kann jedoch für die Detektion von Tumoren vernachlässigt werden. Grund hierfür ist der Ursprung der CEST-Signale von Proteinen *in vivo* aus dem Zellinneren. Änderungen des pH-Werts in Tumoren können jedoch hauptsächlich im extrazellulären Kompartiment beobachtet werden (Chen u. a., 2015; Gillies u. a., 2004; Kato u. a., 2013; Raghunand u. a., 1999). Dabei tritt eine Übersäuerung auf, welche eine Abschwächung der CA-Signale von an Stickstoff gebundenen Protonen in Proteinen zur Folge hätte (Abbildung 2.4). Eine Änderung des intrazellulären pH-Werts stünde somit im Widerspruch zur Detektion eines ansteigenden CA-Signals von Amid-Protonen in Tumoren (Windschuh u. a., 2015a,b).

Zur Berechnung des DPC in Glioblastom-Patienten wurde, wie in Unterabschnitt 5.2.1 motiviert, das separierte CA-Signal von Amid-Protonen, sowie das rNOE-Signal aliphatischer Protonen verwendet. Die Abschwächung der rNOE-Signale aliphatischer Protonen im Bereich von nekrotischem und tumorösem Gewebe ist in Einklang mit den Beobachtungen mehrerer anderer Studien (Zaiss u. a., 2015a; Jones u. a., 2013; Zaiss u. a., 2013; Xu u. a., 2014b; Paech u. a., 2014). Berichte über Änderungen des CA-Signals von Amid-Protonen in Tumoren sind hingegen widersprüchlich und hängen stark von der verwendeten Evaluierungsmethode der aufgenommenen Z-Spektren ab (Zaiss u. a., 2015a; Jones u. a., 2013; Xu u. a., 2014b; Zhou u. a., 2013; Zu u. a., 2013). Die inkonsistenten Aussagen sind möglicherweise auf überlappende rNOE-Signale von aromatischen Protonen zurückzuführen, welche bisher nicht beachtet wurden. Eine Separation des CA_{Amid} -Signals vom Untergrund der rNOE-Signale aromatischer Protonen beim Frequenzoffset +3,5 ppm ist mit Hilfe der afAREX-Methode (Unterabschnitt 3.3.4) möglich. Andere Methoden zur Trennung dieser beiden CEST-Signale (Unterabschnitt 3.3.1) können auf Grund einer vergleichsweise geringen spektralen Auflösung der Z-Spektren von lebendem Gewebe an einem Ganzkörper-MR-Tomographen nicht verwendet werden. Mit Hilfe der afAREX-Methode wird der Anteil der rNOE-Signale aromatischer Protonen vom Gesamtsignal $AREX(+3,5 \text{ ppm})$ mittels des rNOE-Signals aliphatischer Protonen ($\Delta\omega = -3,5 \text{ ppm}$) abgeschätzt. In diesem Kontext wird das Verhältnis von rNOE-Signalen aromatischer und aliphatischer Protonen als Faktor r_{rNOE} bezeichnet (Gleichung 3.13). Zur Berechnung des DPC in menschlichem Gehirngewebe kann ein r_{rNOE} von 0,2 angenommen werden. Kleine Änderungen im Bereich von $\Delta r_{rNOE} \approx \pm 0,1$ haben dabei bemerkenswerterweise keinen Einfluss auf den ausgeprägten Kontrast zwischen gesundem und tumorösem Gewebe. Außerdem können Variationen von r_{rNOE} zwischen grauer und weißer Hirnsubstanz vernachlässigt werden (Abbildung 4.24). Das Verhältnis $r_{rNOE} = 0,2$ wurde mit Hilfe einer Untersuchung von homogenisiertem Tierhirngewebe ermittelt (Abbildung 4.23). Erstaunlicherweise ist dabei eine gute Übereinstimmung der charakteristischen CEST-Signale in den Z-Spektren von menschlichem und tierischem Gehirngewebe beobachtbar, wodurch ein Transfer des ermittelten Verhältnisses gerechtfertigt ist.

In den DPC-Aufnahmen von Glioblastom-Patienten ist am Rand der Tumoren ein diffuses Si-

5 Diskussion

gnal beobachtbar, welches in den Kontrastmittel-verstärkten T_1 -gewichteten (T_1 -KM) Aufnahmen nicht detektierbar ist (weiße Pfeile in Abbildung 4.24). Inwiefern dieses Signal mit einer physiologischen Änderung des Gewebes in Verbindung gesetzt werden kann muss mit Hilfe einer Verlaufsstudie geklärt werden. Eine Korrelation dieses diffusen Signals mit der Ausbreitung des Tumorgewebes wäre dabei eine wertvolle Information für chirurgische Eingriffe.

5.3 Ausblick

5.3.1 Detektion der Protein-Denaturierung mittels CEST *in vivo*

Die Untersuchung Hitze-geschockter Hefezellen könnte eine Möglichkeit darstellen, die Detektion einer Protein-Denaturierung mittels CEST *in vivo* zu beweisen. Mit Hilfe eines milden Hitzeschocks bei Temperaturen unter $\approx 44^\circ\text{C}$ kann eine partielle Aggregation des Proteoms hervorgerufen werden, welche nicht letal für Hefezellen ist. Eine vollständige Aggregation wird dabei durch sog. Hitzeschock-Proteine (engl. *heat shock protein* (HSP)) verhindert (Sanchez u. a., 1992; Parsell u. a., 1993). Außerdem übernehmen diese HSP den Abbau von aggregierten Proteinen im Zellinneren. Der Signatur der Protein-Aggregation zufolge sollte somit nach einem milden Hitzeschock eine Signalabschwächung der globalen CEST-Signale von Proteinen in Hefezellen zu beobachten sein. Aufgrund des Abbaus von aggregierten Proteinen, ist nach einer gewissen Zeit außerdem ein Rücklauf dieser Signalabschwächung zu erwarten. Mit Hilfe einer genetischen Modifikation ist es möglich, die Expressierung der HSP zu unterbinden und somit das Proteom anfälliger für eine Aggregation zu machen. Zusätzlich können die aggregierten Proteine in diesem Fall weniger effizient abgebaut werden. Im Vergleich zu den CEST-Signaländerungen in nativen Hefezellen sollte daher eine stärkere Signalabschwächung nach einem Hitzeschock zu beobachten sein. Außerdem ist ein langsamerer Rücklauf dieser Signalabschwächung zu erwarten. Eine Detektion dieser charakteristischen CEST-Signaländerungen in Hefezellen nach einem milden Hitzeschock würde die Detektion einer Protein-Denaturierung mittels CEST *in vivo* beweisen.

Die beschriebenen Experimente wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, wobei eine Abschwächung der globalen CEST-Signale von Proteinen nach einem milden Hitzeschock beobachtet werden konnte. Allerdings traten dabei mehrere Probleme auf, wodurch eine eindeutige Zuordnung der beobachteten CEST-Signaländerungen zu einer Protein-Aggregation nicht möglich war. Durch den Hitzeschock wurde der Gärungsprozess von Hefezellen aktiviert, wobei Kohlenstoffdioxid frei gesetzt wurde. Das Auftreten von Gasbläschen in den Modelllösungen der Hefezellen erzeugte dabei starke lokale Inhomogenitäten des statischen Grundmagnetfelds B_0 . Außerdem ist der Einfluss des Nahrungsmangels aufgrund einer Aufbewahrung der Hefezellen während den NMR-Messung in reinen Salzlösungen unklar. Zusätzlich muss die Überlebensrate der Hefezellen nach dem Hitzeschock mit Hilfe einer Zellproliferation überprüft werden. Die gewonnenen Ergebnisse motivieren allerdings zu eingehenderen Untersuchungen dieser Sachverhalte in einer weiteren Studie.

5.3.2 Zweidimensionale CEST-Spektroskopie

Die zweidimensionale (2D) CEST-Spektroskopie ist ein neuartiger Ansatz, um intra-molekulare Magnetisierungstransfer-Pfade zwischen unterschiedlichen Pools von Protonen zu identifizieren (Goerke u. a., 2015b). Mit Hilfe einer alternierenden RF-Einstrahlung werden dabei simultan CEST-Effekte bei einem konstanten Frequenzoffset $\Delta\omega_{\text{CnstSat}}$ gesättigt, während zusätzlich das Z-Spektrum bei verschiedenen Frequenzoffsets $\Delta\omega$ abgetastet wird. Eine Wiederholung dieser Messung für diverse $\Delta\omega_{\text{CnstSat}}$ führt zu einem 2D-Z-Spektrum. Isolierte Sättigungstransfer-Effekte $\text{AREX}(\Delta\omega, \Delta\omega_{\text{CnstSat}})$ können in Analogie zur konventionellen CEST-Spektroskopie unter Verwendung der AREX-Auswertung (Unterabschnitt 3.3.1) berechnet werden. Die direkte Wassersättigung wird dabei mit Hilfe eines 2D-Lorentz-Fits approximiert. Aufgrund der

Additivität von AREX-Signalen (Gleichung 2.68) kann der sog. Sättigungsübertrag (engl. *saturation crosstalk*, T) zwischen unterschiedlichen CEST-Effekten anhand folgender Gleichung berechnet werden:

$$T_{\Delta\omega, CnstSat}(\Delta\omega) = AREX_{ref}(\Delta\omega) + AREX_{ref}(\Delta\omega_{CnstSat}) - AREX(\Delta\omega, \Delta\omega_{CnstSat}) \quad (5.3)$$

wobei $AREX_{ref}(\Delta\omega)$, bzw. $AREX_{ref}(\Delta\omega_{CnstSat})$ dem Referenzspektrum bei einer off-resonanten RF-Einstrahlung in der jeweils anderen Frequenzdimension ($\Delta\omega_{CnstSat}$ bzw. $\Delta\omega$) entspricht.

Normalerweise wird angenommen, dass die verschiedenen CEST-Effekte im Z-Spektrum unabhängig voneinander sind. In Proteinen kann allerdings ein Sättigungsübertrag zwischen CEST-Signalen im Bereich positiver und negativer Frequenzoffsets beobachtet werden (Abbildung 5.1). Dabei können lediglich Signale auf den Nebendiagonalen ($|\Delta\omega - \Delta\omega_{CnstSat}| > 3 \text{ ppm}$) mit einem Sättigungsübertrag in Verbindung gebracht werden. Grund hierfür ist ein ansteigender effektiver *duty cycle* (DC, Gleichung 2.61) im Fall einer alternierenden Sättigung bei spektral nahe aneinanderliegenden Frequenzoffsets ($|\Delta\omega - \Delta\omega_{CnstSat}| < 3 \text{ ppm}$) (Roeloffs u. a., 2015).

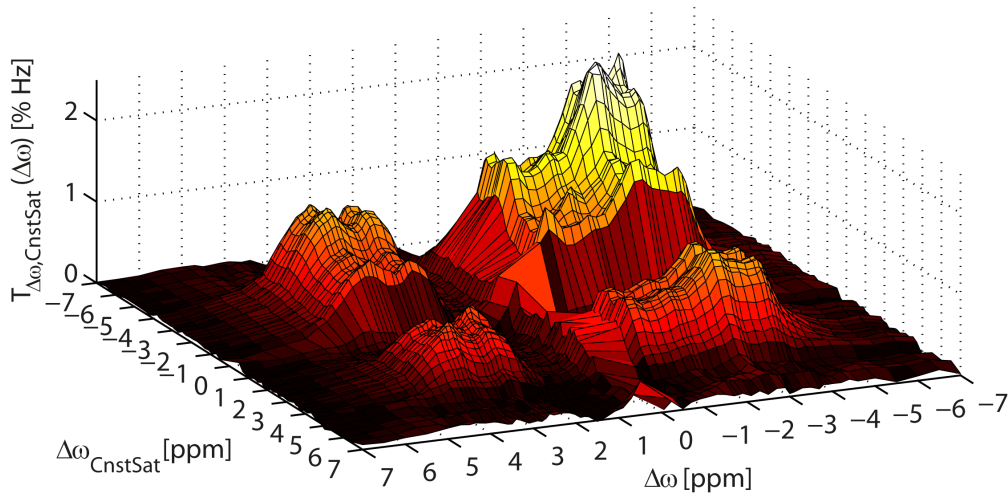


Abbildung 5.1: 2D-CEST-Spektrum ($B_{1,mean} = 0,45 \mu\text{T}$, $t_{sat} = 5,5 \text{ s}$) von BSA bei $pH = 7$ und $T = 25^\circ\text{C}$. Signale auf den Nebendiagonalen im Bereich $|\Delta\omega - \Delta\omega_{CnstSat}| > 3 \text{ ppm}$ werden durch einen Sättigungsübertrag zwischen den Frequenzoffsets $\Delta\omega$ und $\Delta\omega_{CnstSat}$ hervorgerufen. Der stärkste Sättigungsübertrag $T_{\Delta\omega, CnstSat}(\Delta\omega)$ mit einem Wert von $\approx 20\%$ im Vergleich zum konventionellen Signal $AREX(\Delta\omega)$ ist zwischen den Frequenzoffsets $-3,0 \text{ ppm}$ und $3,4 \text{ ppm}$ detektierbar. Die T_1 -Relaxationszeit der Wasserprotonen wurde zu $0,97 \text{ s}$ bestimmt. Die Abbildung wurde veröffentlicht in (Goerke u. a., 2015b).

Der beobachtete Sättigungsübertrag in Proteinen kann auf intra-molekulare Spin-Diffusionsprozesse (Unterabschnitt 2.2.2) zurückgeführt werden. Somit sind mit Hilfe der 2D-CEST-Spektroskopie möglicherweise neue Einblicke in die molekularen Mechanismen von rNOE-Signalen möglich. Dabei wäre prinzipiell eine Identifikation der chemisch austauschenden Protonen möglich, welche für den rNOE-Magnetisierungstransfer zwischen fest gebundenen Protonen und freiem Wasser verantwortlich sind. Außerdem ist ein MR-Signal, welches sehr stark

von intra-molekularen Magnetisierungstransfer-Mechanismen abhängt von besonderem Interesse für eine selektive Detektion des Faltungszustands von Proteinen. Mit Hilfe einer breitbandigen Sättigung der CEST-Effekte im Bereich positiver Frequenzoffsets sollte daher ein Sättigungsübertrag in den rNOE-Signalen von aliphatischen Protonen detektierbar sein, welcher sehr sensitiv auf eine Protein-Denaturierung reagiert.

6 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses der Entfaltung und Aggregation auf die *Chemical Exchange Saturation Transfer* (CEST)-Signale von Proteinen. Dabei wurde ebenfalls die Möglichkeit der Anwendung der gewonnenen Erkenntnisse zur selektiven Detektion eines denaturierten Proteoms *in vivo* überprüft.

Die Untersuchung einzelner spezifischer Protein-Isoformen ermöglichte in einem ersten Schritt eine separate Analyse der Protein-Entfaltung und -Aggregation. Dabei konnten charakteristische Signaländerungen beobachtet werden, welche in einer Signatur der Protein-Entfaltung und -Aggregation zusammengefasst wurden. Unter Entfaltung, wie auch Aggregation, wurde gleichermaßen eine Abschwächung der *exchange-relayed Nuclear Overhauser Effect* (rNOE)-Signale von aliphatischen und aromatischen Protonen beobachtet. Die gegenläufige Änderung der CEST-Effekte von chemisch austauschenden (CA) Protonen – mit einer Verstärkung unter Entfaltung und einer Abschwächung unter Aggregation – ermöglichte jedoch eine Unterscheidung dieser beiden Vorgänge mittels CEST. In diesem Kontext konnten rNOE-Signale von aromatischen Protonen im Bereich positiver Frequenzoffsets im Z-Spektrum identifiziert werden. Die Berücksichtigung dieser Signale war aufgrund der spektralen Überlappung mit CA-Effekten essentiell für die korrekte Interpretation der beobachteten Signaländerungen. Mit Hilfe einer quantitativen Analyse der CEST-Signale von Proteinen konnte außerdem der Ursprung der charakteristischen Signaländerungen unter Denaturierung auf einer molekularen Ebene verstanden werden. Dabei konnte die Signatur der Protein-Entfaltung in erster Linie auf eine veränderte Anzahl an Protonen pro Protein, die mittels CEST detektierbar sind, zurückgeführt werden. Bemerkenswerterweise waren Signaländerungen aufgrund veränderter Magnetisierungstransfer-Raten hingegen vernachlässigbar.

In Annäherung an das komplexe Zusammenspiel von Proteinen in einem lebenden Organismus wurde in einem zweiten Schritt das Lysat von Hefezellen untersucht. Dabei konnte bestätigt werden, dass das rNOE-Signal aliphatischer und aromatischer Protonen sowie das CA-Signal von Amid-Protonen hauptsächlich mit dem löslichen Teil des Proteoms in Verbindung gebracht werden kann. Eine Denaturierung der Proteine im Lysat konnte somit ebenfalls in Anwesenheit anderer CEST-Effekte von diversen intrazellulären Komponenten (z.B. Metaboliten) mittels CEST detektiert werden. Eine eindeutige Differenzierung zwischen Protein-Entfaltung und -Aggregation war jedoch mit Hilfe der in dieser Arbeit verwendeten Denaturierungsexperimente in Lysaten nicht möglich.

Die gewonnenen Erkenntnisse konnten dazu verwendet werden, einen Kontrast zu entwickeln, welcher sehr sensitiv auf die CEST-Signaländerungen von Proteinen unter Denaturierung reagiert. Da die Information über den Faltungszustand von Proteinen mittels CEST im Wassersignal gespeichert und detektiert wird, konnte der Kontrast in einem Magnetresonanz (MR)-Bild visualisiert werden. Für die Anwendung des Kontrastes *in vivo* spielte die Berücksichtigung der rNOE-Signale von aromatischen Protonen eine wesentliche Rolle. Die Berechnung des Kontrastes in CEST-Bilddaten von Glioblastom-Patienten ermöglichte eine klare Abgrenzung der

6 Zusammenfassung

Tumor-Areale vom umliegenden Gehirngewebe. Bemerkenswerterweise trat dabei lediglich im Bereich der Tumoren eine Signalerhöhung auf, wohingegen der Kontrast zwischen grauer und weißer Hirnsubstanz sich annähernd ausgeglichen darstellte. Das gewonnene Verständnis über den Einfluss der Entfaltung und Aggregation auf die CEST-Signale von Proteinen kann möglicherweise zur Detektion diverser Pathologien (z.B. Morbus Alzheimer) verwendet werden, welche auf eine Degenerierung von Proteinen zurückgeführt werden.

A Anhang

A.1 Messparameter

In diesem Abschnitt sind die jeweiligen Parameter aller erstellten Modelllösungen, sowie die zugehörigen Einstellungen der verwendeten Messsysteme aufgelistet. Die Angaben wurden dabei nach den Abbildungen der Messergebnisse in Kapitel 4 gegliedert. Für eine detaillierte Beschreibung der hier aufgelisteten Messparameter wird auf Kapitel 3 verwiesen.

| Abb. | Modelllösungen | Messsysteme |
|------|---|--|
| 4.1 | <ul style="list-style-type: none"> • Inhaltsstoffe: <ul style="list-style-type: none"> ◦ BSA ($c_m = 2,5\%$ (w/v)) ◦ Gd-DTPA ($c = 0/100/150/300\ \mu\text{M}$) ◦ PBS (Na-Phosphat) • Milieu: <ul style="list-style-type: none"> ◦ $pH = 7$ ◦ $T = 25^\circ\text{C}$ | <ul style="list-style-type: none"> • MR-Spektrometer ($B_0 = 14,1\ \text{T}$): <ul style="list-style-type: none"> ◦ CEST-Spektroskopie: <ul style="list-style-type: none"> ▷ Sättigung: $B_1 = 0,75\ \mu\text{T}$ $t_{sat} = 15\ \text{s}$ $t_{rel} = 1\ \text{s}$ $N_{sample} = 99$ ($\Delta\omega_{sample} = \pm 10\ \text{ppm}$) ▷ Auswertung: AREX (\mathcal{L}_{DS}-Fit) $\Delta\omega_{fit} = [-10; -5,5] \& [-0,3; 0,3] \& [5,5; 10]\ \text{ppm}$ ◦ T_1-Sequenz: $t_{sat} = 15\ \text{s}$ $T_I = 10\ \text{ms} - 20\ \text{s}$ ($N_I = 25$) |
| 4.2 | <ul style="list-style-type: none"> • Inhaltsstoffe: <ul style="list-style-type: none"> ◦ BSA ($c_m = 2,5\%$ (w/v)) ◦ SDS ($c = 0 - 140\ \text{mM}$) ◦ PBS (Na-Phosphat) • Milieu: <ul style="list-style-type: none"> ◦ $pH = 7$ ◦ $T = 25^\circ\text{C}$ | <ul style="list-style-type: none"> • MR-Spektrometer ($B_0 = 14,1\ \text{T}$): <ul style="list-style-type: none"> ◦ CEST-Spektroskopie: <ul style="list-style-type: none"> ▷ Sättigung: $B_1 = 0,75\ \mu\text{T}$ $t_{sat} = 12\ \text{s}$ $t_{rel} = 1\ \text{s}$ $N_{sample} = 117$ ($\Delta\omega_{sample} = \pm 7\ \text{ppm}$) ▷ Auswertung: AREX (\mathcal{L}_{DS}-Fit) $\Delta\omega_{fit} = [-7; -5,5] \& [-0,3; 0,3] \& [5,5; 7]\ \text{ppm}$ ◦ ^1H-Spektroskopie: |

| | | |
|-----|--|---|
| | | $n_{\text{ex}} = 64$ $t_{\text{sat}} = 5 \text{ s}$ $\tau_M = 50 \text{ ms}$ <ul style="list-style-type: none"> ◦ T_1-Sequenz: $t_{\text{sat}} = 15 \text{ s}$ $T_I = 10 \text{ ms} - 10 \text{ s}$ ($N_I = 22$) |
| 4.3 | siehe Abbildung. 4.2 | <ul style="list-style-type: none"> • MR-Spektrometer ($B_0 = 14,1 \text{ T}$): ◦ CEST-Spektroskopie: <ul style="list-style-type: none"> ▷ Denaturierungskurven: $\Delta A_{\text{REX}}(\Delta\omega = -3,2 / -1,8 / 2,0 / 2,7 / 3,5 \text{ ppm})$ • FL-Spektrometer: <ul style="list-style-type: none"> ▷ Auswertung: $\Delta\lambda_{\text{int}} = 322 - 400 \text{ nm}$ ΔFL |
| 4.5 | <ul style="list-style-type: none"> • Inhaltsstoffe: <ul style="list-style-type: none"> ◦ BSA ($c_m = 2,5 \text{ \% (w/v)}$) ◦ SDS ($c = 0 / 140 \text{ mM}$) ◦ PBS (Na-Phosphat) • Milieu: <ul style="list-style-type: none"> ◦ $pH = 6,5 / 7,0 / 7,5$ ◦ $T = 25 / 37^\circ \text{C}$ | <ul style="list-style-type: none"> • MR-Spektrometer ($B_0 = 14,1 \text{ T}$): ◦ CEST-Spektroskopie: <ul style="list-style-type: none"> ▷ Sättigung: $B_1 = 0,75 \mu \text{ T}$ $t_{\text{sat}} = 12 \text{ s}$ $t_{\text{rel}} = 1 \text{ s}$ $N_{\text{sample}} = 117$ ($\Delta\omega_{\text{sample}} = \pm 7 \text{ ppm}$) ▷ Auswertung: $A_{\text{REX}} (\mathcal{L}_{\text{DS-Fit}})$ $\Delta\omega_{\text{fit}} = [-7; -5,5] \& [-0,3; 0,3] \& [5,5; 7] \text{ ppm}$ ◦ T_1-Sequenz: $t_{\text{sat}} = 15 \text{ s}$ $T_I = 10 \text{ ms} - 10 \text{ s}$ ($N_I = 22$) |
| 4.6 | <ul style="list-style-type: none"> • Inhaltsstoffe: <ul style="list-style-type: none"> ◦ BSA ($c_m = 2,5 \text{ \% (w/v)}$) ◦ PBS (Na-Phosphat) • Milieu: <ul style="list-style-type: none"> ◦ $pH = 6,5 / 7,0 / 7,5$ ◦ $T = 25^\circ \text{C}$ | <ul style="list-style-type: none"> • MR-Spektrometer ($B_0 = 14,1 \text{ T}$): ◦ WEX-Spektroskopie: $n_{\text{ex}} = 10$ $T_M = 5, 10, 25, 50, 90, 150, 250, 450, 700, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000 \text{ ms}$ $\Delta\omega_{\text{WATERGATE}} = \pm 3,33 \text{ ppm}$ $T_E = 3,5 \text{ ms}$ |

| | | |
|-----|--|---|
| | | $t_{rel} = 10\text{ s}$ |
| 4.7 | <ul style="list-style-type: none"> ● Inhaltsstoffe: <ul style="list-style-type: none"> ○ BSA ($c_m = 2,5\%$ (w/v)) ○ SDS ($c = 0 - 140\text{ mM}$) ○ PBS (Na-Phosphat) ● Milieu: <ul style="list-style-type: none"> ○ $pH = 7$ ○ $T = 25^\circ\text{C}$ | <ul style="list-style-type: none"> ● Ganzkörper-MR-Tomograph ($B_0 = 7\text{ T}$): <ul style="list-style-type: none"> ○ CEST-Bildgebung: <ul style="list-style-type: none"> ▷ Sättigung: $B_{1,mean} = 0,9\text{ }\mu\text{T}$ $t_{sat} = 11,25\text{ s}$ $N_{pulse} = 450$ ($t_p = 15\text{ ms}$) $DC = 0,6$ ($t_d = 10\text{ ms}$) $t_{rel} = 1\text{ ms}$ $N_{sample} = 75$ ($\Delta\omega_{sample} = \pm 150\text{ ppm}$) ▷ GRE-Bildgebung: $nex = 1$ $T_E = 3,76\text{ ms}$ $T_R = 7,6\text{ ms}$ $FOV 180 \times 180\text{ mm}^2$ $Matrix 128 \times 128$ $Auflösung 1,4 \times 1,4 \times 5\text{ mm}^3$ ▷ Auswertung: $AREX$ (Multi-\mathcal{L}-Fit, ($6\mathcal{L}$)) $\Delta\omega_{\mathcal{L}max,type,i} \approx -3,5 / -2,5 / 0 / 2 / 2,7 / 3,5\text{ ppm}$ ▷ Kontraste $AREX_{rNOE,aliphatisch}(-3,5\text{ ppm})$ $\Delta\omega_{int} = [-4; -3]\text{ ppm}$ $AREX_{rNOE,aromatisch}(3,5\text{ ppm})$ $\Delta\omega_{int} = [3,5; 4]\text{ ppm}$ $AREX_{CA,Amin}(2,7\text{ ppm})$ $\Delta\omega_{int} = [2,65; 2,75]\text{ ppm}$ ○ T_1-Bildgebung: $nex = 1$ $T_E = 1,66\text{ ms}$ $T_R = 9\text{ s}$ $FOV 150 \times 150\text{ mm}^2$ $Matrix 192 \times 192$ $Auflösung 0,8 \times 0,8 \times 4\text{ mm}^3$ $T_I = 1 - 8\text{ s}$ ($N_I = 9$) |
| 4.8 | <ul style="list-style-type: none"> ● Inhaltsstoffe: <ul style="list-style-type: none"> ○ BSA ($c_m = 2,5\%$ (w/v)) ○ SDS ($c = 0/140\text{ mM}$) ○ PBS (Na-Phosphat) | <ul style="list-style-type: none"> ● MR-Spektrometer ($B_0 = 14,1\text{ T}$): <ul style="list-style-type: none"> ○ CEST-Spektroskopie: <ul style="list-style-type: none"> ▷ Sättigung: $B_1 = 0,75 / 1 / 1,5 / 2\text{ }\mu\text{T}$ |

| | | |
|------|--|---|
| | <ul style="list-style-type: none"> • Milieu: <ul style="list-style-type: none"> ◦ $pH = 7$ ◦ $T = 25^{\circ}\text{C}$ | $t_{sat} = 12\text{ s}$ $t_{rel} = 1\text{ s}$ $N_{sample} = 117 (\Delta\omega_{sample} = \pm 7\text{ ppm})$ ▷ Auswertung: AREX (\mathcal{L}_{DS} -Fit) $\Delta\omega_{fit} = [-7; -5] \text{ \& } [-0,3; 0,3] \text{ \& } [5; 7] \text{ ppm}$ ◦ T_1 -Sequenz: $t_{sat} = 15\text{ s}$ $T_I = 10\text{ ms} - 10\text{ s} (N_I = 22)$ |
| 4.9 | <ul style="list-style-type: none"> • Inhaltsstoffe: <ul style="list-style-type: none"> ◦ BSA ($c_m = 2,5\%(\text{w/v})$) ◦ SDS ($c = 0/140\text{ mM}$) ◦ PBS (Na-Phosphat) • Milieu: <ul style="list-style-type: none"> ◦ $pH = 7,5$ ◦ $T = 25^{\circ}\text{C}$ | <ul style="list-style-type: none"> • MR-Spektrometer ($B_0 = 14,1\text{ T}$): <ul style="list-style-type: none"> ◦ WEX-Spektroskopie: $n_{ex} = 10$ $T_M = 5, 10, 25, 50, 90, 150, 250, 450, 700, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000\text{ ms}$ $\Delta\omega_{WATERGATE} = \pm 3,33\text{ ppm}$ $T_E = 3,5\text{ ms}$ $t_{rel} = 10\text{ s}$ |
| 4.10 | <ul style="list-style-type: none"> • Inhaltsstoffe: <ul style="list-style-type: none"> ◦ HTN-GST ($c = 20/30/60\text{ }\mu\text{M}$) ◦ PBS • Milieu: <ul style="list-style-type: none"> ◦ $pH = 7,7$ ◦ $T = 25^{\circ}\text{C}$ | <ul style="list-style-type: none"> • MR-Spektrometer ($B_0 = 14,1\text{ T}$): <ul style="list-style-type: none"> ◦ CEST-Spektroskopie: ▷ Sättigung: $B_1 = 0,8\text{ }\mu\text{T}$ $t_{sat} = 12\text{ s}$ $t_{rel} = 1\text{ ms}$ $N_{sample} = 161 (\Delta\omega_{sample} = \pm 150\text{ ppm})$ ▷ Auswertung: AREX (\mathcal{L}_{DS}-Fit) $\Delta\omega_{fit} = [-150; -6] \text{ \& } 0 \text{ \& } [6; 150] \text{ ppm}$ ◦ T_1-Sequenz: $t_{sat} = 15\text{ s}$ $T_I = 10\text{ ms} - 20\text{ s} (N_I = 25)$ |
| 4.11 | <ul style="list-style-type: none"> • Inhaltsstoffe: <ul style="list-style-type: none"> ◦ HTN-GST ($c = 20/30/60\text{ }\mu\text{M}$) ◦ PSP ◦ PBS | siehe Abbildung. 4.10 |

| | | |
|------|--|---|
| | <ul style="list-style-type: none"> • Milieu: <ul style="list-style-type: none"> ◦ $pH = 7,7$ ◦ $T = 25^{\circ}\text{C}$ | |
| 4.12 | <ul style="list-style-type: none"> • Inhaltsstoffe: <ul style="list-style-type: none"> ◦ β-Amyloid ($c = 50\mu\text{M}$) ◦ PBS • Aggregation: <ul style="list-style-type: none"> ◦ $t = 24\text{h}$ • Milieu: <ul style="list-style-type: none"> ◦ $pH = 7,2$ ◦ $T = 37^{\circ}\text{C}$ | <ul style="list-style-type: none"> • MR-Spektrometer ($B_0 = 14,1\text{ T}$): <ul style="list-style-type: none"> ◦ CEST-Spektroskopie: <ul style="list-style-type: none"> ▷ Sättigung: $B_1 = 0,75\mu\text{T}$ $t_{\text{sat}} = 14\text{ s}$ $t_{\text{rel}} = 1\text{ ms}$ $N_{\text{sample}} = 161$ ($\Delta\omega_{\text{sample}} = \pm 150\text{ ppm}$) ▷ Auswertung: Mittelung (linker & rechter DP) $AREX$ ($\mathcal{L}_{DS} + \text{Lin. Fit}$) $\Delta\omega_{\text{fit}} = [-10; -8] \text{ \& } [-0,05; 0,05] \text{ \& } [8; 10] \text{ ppm}$ ◦ T_1-Sequenz: $t_{\text{sat}} = 15\text{ s}$ $T_I = 10\text{ ms} - 20\text{ s}$ ($N_I = 25$) |
| 4.13 | <ul style="list-style-type: none"> • Inhaltsstoffe: <ul style="list-style-type: none"> ◦ β-Amyloid ($c = 150\mu\text{M}$) ◦ PBS • Milieu: <ul style="list-style-type: none"> ◦ $pH = 7,3$ ◦ $T = 37^{\circ}\text{C}$ | siehe Abbildung. 4.12 |
| 4.14 | siehe Abbildung. 4.13 | <ul style="list-style-type: none"> • MR-Spektrometer ($B_0 = 14,1\text{ T}$): <ul style="list-style-type: none"> ◦ CEST-Spektroskopie: <ul style="list-style-type: none"> ▷ Denaturierungskurven: $\Delta AREX(\Delta\omega = -3,7\text{ ppm})$ $\Delta AREX_{TPM}(\Delta\omega = 3,6\text{ ppm})$ $\omega_1 = 3,0\text{ ppm} / \omega_2 = 4,3\text{ ppm}$ |
| 4.15 | <ul style="list-style-type: none"> • Inhaltsstoffe: <ul style="list-style-type: none"> ◦ Hefezellen ◦ PBS (Na-K-Phosphat) • Milieu: | <ul style="list-style-type: none"> • MR-Spektrometer ($B_0 = 14,1\text{ T}$): <ul style="list-style-type: none"> ◦ CEST-Spektroskopie: <ul style="list-style-type: none"> ▷ Sättigung: $B_1 = 0,6\mu\text{T}$ $t_{\text{sat}} = 4\text{ s}$ |

| | | |
|------|---|---|
| | <ul style="list-style-type: none"> ○ $pH \approx 6,6$ ○ $T = 25^\circ\text{C}$ | $t_{rel} = 1\text{ s}$ $N_{sample} = 147$ ($\Delta\omega_{sample} = \pm 300\text{ ppm}$) ▷ Auswertung: $AREX$ ($\mathcal{L}_{DS} + \mathcal{L}_{MT}$ -Fit) $\Delta\omega_{fit} = [-300; -5,4] \text{ \& } [-0,4; 0,6] \text{ \& } [5,4; 300] \text{ ppm}$ ○ T_1 -Sequenz: $t_{sat} = 15\text{ s}$ $T_I = 10\text{ ms} - 20\text{ s}$ ($N_I = 25$) |
| 4.16 | <ul style="list-style-type: none"> ● Inhaltsstoffe: <ul style="list-style-type: none"> ○ lysierte Hefezellen ○ PBS (Na-K-Phosphat) ● Milieu: <ul style="list-style-type: none"> ○ $pH = 7,2$ ○ $T = 25^\circ\text{C}$ | <ul style="list-style-type: none"> ● MR-Spektrometer ($B_0 = 14,1\text{ T}$): <ul style="list-style-type: none"> ○ CEST-Spektroskopie: <ul style="list-style-type: none"> ▷ Sättigung: $B_1 = 0,75\text{ }\mu\text{T}$ $t_{sat} = 14\text{ s}$ $t_{rel} = 1\text{ s}$ $N_{sample} = 161$ ($\Delta\omega_{sample} = \pm 150\text{ ppm}$) ▷ Auswertung: $AREX$ ($\mathcal{L}_{DS} + \mathcal{L}_{MT}$-Fit) $\Delta\omega_{fit} = [-150; -8] \text{ \& } [-0,3; 0,35] \text{ \& } [8; 150] \text{ ppm}$ $AREX_{TPM}(\Delta\omega = 3,6\text{ ppm})$ $\omega_1 = 2,9\text{ ppm} / \omega_2 = 4,3\text{ ppm}$ ○ T_1-Sequenz: $t_{sat} = 15\text{ s}$ $T_I = 10\text{ ms} - 20\text{ s}$ ($N_I = 25$) |
| 4.17 | <ul style="list-style-type: none"> ● Inhaltsstoffe: <ul style="list-style-type: none"> ○ Hefezellen-Lysat ○ PBS (Na-K-Phosphat) ● Milieu: <ul style="list-style-type: none"> ○ $pH = 6,8/7,0/7,2/7,4/7,6$ ○ $T = 25/37^\circ\text{C}$ | <ul style="list-style-type: none"> ● MR-Spektrometer ($B_0 = 14,1\text{ T}$): <ul style="list-style-type: none"> ○ CEST-Spektroskopie: <ul style="list-style-type: none"> ▷ Sättigung: $B_1 = 0,75\text{ }\mu\text{T}$ $t_{sat} = 14\text{ s}$ $t_{rel} = 1\text{ s}$ $N_{sample} = 161$ ($\Delta\omega_{sample} = \pm 150\text{ ppm}$) ▷ Auswertung: $AREX$ ($\mathcal{L}_{DS} + \mathcal{L}_{MT}$-Fit) $\Delta\omega_{fit} = [-150; -8] \text{ \& } [-0,3; 0,35] \text{ \& } [8; 150] \text{ ppm}$ ○ T_1-Sequenz: $t_{sat} = 15\text{ s}$ $T_I = 10\text{ ms} - 20\text{ s}$ ($N_I = 25$) |

| | | |
|------|--|---|
| 4.18 | <ul style="list-style-type: none"> ● Inhaltsstoffe: <ul style="list-style-type: none"> ○ lysierte Hefezellen ○ PBS (Na-K-Phosphat) ● Hitzeschock: <ul style="list-style-type: none"> ○ $t = 1 \text{ h}$ ○ $T = 65^\circ\text{C}$ ● Milieu: <ul style="list-style-type: none"> ○ $pH = 7,2$ ○ $T = 25^\circ\text{C}$ | siehe Abbildung. 4.16 |
| 4.19 | <ul style="list-style-type: none"> ● Inhaltsstoffe: <ul style="list-style-type: none"> ○ Hefezellen-Lysat ○ PBS (Na-K-Phosphat) ● Milieu: <ul style="list-style-type: none"> ○ $pH = 7,2$ ○ $T = 25^\circ\text{C}$ | siehe Abbildung. 4.17 |
| 4.20 | <ul style="list-style-type: none"> ● Inhaltsstoffe: <ul style="list-style-type: none"> ○ Hefezellen-Lysat ○ SDS ($c = 0 - 120 \text{ mM}$) ○ PBS (Na-Phosphat) ● Milieu: <ul style="list-style-type: none"> ○ $pH = 7,2$ ○ $T = 37^\circ\text{C}$ | <ul style="list-style-type: none"> ● MR-Spektrometer ($B_0 = 14,1 \text{ T}$): <ul style="list-style-type: none"> ○ CEST-Spektroskopie: <ul style="list-style-type: none"> ▷ Sättigung: <ul style="list-style-type: none"> $B_1 = 0,75 \mu\text{T}$ $t_{\text{sat}} = 14 \text{ s}$ $t_{\text{rel}} = 1 \text{ s}$ $N_{\text{sample}} = 161$ ($\Delta\omega_{\text{sample}} = \pm 150 \text{ ppm}$) ▷ Auswertung: <ul style="list-style-type: none"> AREX ($\mathcal{L}_{DS} + \mathcal{L}_{MT}$-Fit) $\Delta\omega_{\text{fit}} = [-150; -8] \text{ \& } [-0,3; 0,35] \text{ \& } [8; 150] \text{ ppm}$ ○ ^1H-Spektroskopie: <ul style="list-style-type: none"> $n_{\text{ex}} = 64$ $t_{\text{sat}} = 5 \text{ s}$ $\tau_M = 50 \text{ ms}$ ○ T_1-Sequenz: <ul style="list-style-type: none"> $t_{\text{sat}} = 15 \text{ s}$ $T_I = 10 \text{ ms} - 20 \text{ s}$ ($N_I = 25$) |

| | | |
|------|-----------------------|--|
| 4.21 | siehe Abbildung. 4.20 | <ul style="list-style-type: none"> • MR-Spektrometer ($B_0 = 14,1 \text{ T}$): <ul style="list-style-type: none"> ◦ CEST-Spektroskopie: <ul style="list-style-type: none"> ▷ Denaturierungskurven: $\Delta AREX(\Delta\omega = -3,6/-1,8 \text{ ppm})$ $\Delta AREX_{TPM}(\Delta\omega = 3,5 \text{ ppm})$ $\omega_1 = 2,8 \text{ ppm} / \omega_2 = 4,0 \text{ ppm}$ • FL-Spektrometer: <ul style="list-style-type: none"> ▷ Auswertung: $\Delta\lambda_{int} = 323 - 400 \text{ nm}$ ΔFL |
| 4.22 | siehe Abbildung. 4.7 | <ul style="list-style-type: none"> • Ganzkörper-MR-Tomograph ($B_0 = 7 \text{ T}$): <ul style="list-style-type: none"> ◦ CEST-Bildgebung: <ul style="list-style-type: none"> ▷ Sättigung: $B_{1,mean} = 0,9 \mu\text{T}$ $t_{sat} = 11,25 \text{ s}$ $N_{pulse} = 450 (t_p = 15 \text{ ms})$ $DC = 0,6 (t_d = 10 \text{ ms})$ $t_{rel} = 1 \text{ ms}$ $N_{sample} = 75 (\Delta\omega_{sample} = \pm 150 \text{ ppm})$ ▷ GRE-Bildgebung: $nex = 1$ $T_E = 3,76 \text{ ms}$ $T_R = 7,6 \text{ ms}$ $FOV 180 \times 180 \text{ mm}^2$ $\text{Matrix } 128 \times 128$ $\text{Auflösung } 1,4 \times 1,4 \times 5 \text{ mm}^3$ ▷ Auswertung: $AREX \text{ (Multi-}\mathcal{L}\text{-Fit, (6}\mathcal{L}\text{))}$ $\Delta\omega_{\mathcal{L}max,type,i} \approx -3,5 / -2,5 / 0 / 2 / 2,7 / 3,5 \text{ ppm}$ ▷ Kontraste $AREX_{rNOE,aliphatisch}(-3,5 \text{ ppm})$ $\Delta\omega_{int} = [-4; -3] \text{ ppm}$ $AREX_{CA,Amin}(2,7 \text{ ppm})$ $\Delta\omega_{int} = [2,65; 2,75] \text{ ppm}$ ◦ T_1-Bildgebung: $nex = 1$ $T_E = 1,66 \text{ ms}$ $T_R = 9 \text{ s}$ $FOV 150 \times 150 \text{ mm}^2$ $\text{Matrix } 192 \times 192$ $\text{Auflösung } 0,8 \times 0,8 \times 4 \text{ mm}^3$ |

| | | |
|------|---|---|
| | | $T_I = 1 - 8 \text{ s } (N_I = 9)$ |
| 4.23 | <ul style="list-style-type: none"> • Inhaltsstoffe: <ul style="list-style-type: none"> ◦ BSA ($c_m = 2,5 \text{ \% (w/v)}$) ◦ PBS (Na-Phosphat) • Milieu: <ul style="list-style-type: none"> ◦ $pH = 7$ ◦ $T = 37^\circ\text{C}$ | <ul style="list-style-type: none"> • MR-Spektrometer ($B_0 = 14,1 \text{ T}$): <ul style="list-style-type: none"> ◦ CEST-Spektroskopie: <ul style="list-style-type: none"> ▷ Sättigung: $B_1 = 0,75 \mu\text{T}$ $t_{sat} = 12 \text{ s}$ $t_{rel} = 1 \text{ s}$ $N_{sample} = 117 (\Delta\omega_{sample} = \pm 7 \text{ ppm})$ ▷ Auswertung: <p>AREX (\mathcal{L}_{DS}-Fit)</p> $\Delta\omega_{fit} = [-7; -5,5] \text{ \& } [-0,3; 0,3] \text{ \& } [5,5; 7] \text{ ppm}$ <p>AREX_{TPM}($\Delta\omega = 3,6 \text{ ppm}$)</p> $\omega_1 = 3,0 \text{ ppm} / \omega_2 = 4,5 \text{ ppm}$ ◦ T_1-Sequenz: $t_{sat} = 15 \text{ s}$ $T_I = 10 \text{ ms} - 10 \text{ s } (N_I = 22)$ |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Inhaltsstoffe: <ul style="list-style-type: none"> ◦ Hefezellen-Lysat ◦ PBS (Na-K-Phosphat) • Milieu: <ul style="list-style-type: none"> ◦ $pH = 7$ ◦ $T = 37^\circ\text{C}$ | <ul style="list-style-type: none"> • MR-Spektrometer ($B_0 = 14,1 \text{ T}$): <ul style="list-style-type: none"> ◦ CEST-Spektroskopie: <ul style="list-style-type: none"> ▷ Sättigung: $B_1 = 0,75 \mu\text{T}$ $t_{sat} = 14 \text{ s}$ $t_{rel} = 1 \text{ s}$ $N_{sample} = 161 (\Delta\omega_{sample} = \pm 150 \text{ ppm})$ ▷ Auswertung: <p>AREX ($\mathcal{L}_{DS} + \mathcal{L}_{MT}$-Fit)</p> $\Delta\omega_{fit} = [-150; -8] \text{ \& } [-0,3; 0,35] \text{ \& } [8; 150] \text{ ppm}$ <p>AREX_{TPM}($\Delta\omega = 3,6 \text{ ppm}$)</p> $\omega_1 = 3,0 \text{ ppm} / \omega_2 = 4,5 \text{ ppm}$ ◦ T_1-Sequenz: $t_{sat} = 15 \text{ s}$ $T_I = 10 \text{ ms} - 20 \text{ s } (N_I = 25)$ |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Inhaltsstoffe: <ul style="list-style-type: none"> ◦ Mäusehirn-Lysat ◦ PBS (Na-K-Phosphat) • Milieu: | <ul style="list-style-type: none"> • MR-Spektrometer ($B_0 = 14,1 \text{ T}$): <ul style="list-style-type: none"> ◦ CEST-Spektroskopie: <ul style="list-style-type: none"> ▷ Sättigung: $B_1 = 0,75 \mu\text{T}$ $t_{sat} = 3,75 \text{ s}$ |

| | | |
|-----|--|---|
| | <ul style="list-style-type: none"> ○ $pH = 7$ ○ $T = 37^\circ\text{C}$ | $t_{rel} = 1\text{ ms}$ $N_{sample} = 161$ ($\Delta\omega_{sample} = \pm 150\text{ ppm}$) ▷ Auswertung: $AREX$ ($\mathcal{L}_{DS} + \mathcal{L}_{MT}$ -Fit) $\Delta\omega_{fit} = [-150; -8] \text{ \& } [-0,35; 0,35] \text{ \& } [8; 150] \text{ ppm}$ $AREX_{TPM}(\Delta\omega = 3,6\text{ ppm})$ $\omega_1 = 3,0\text{ ppm} / \omega_2 = 4,5\text{ ppm}$ ○ T_1 -Sequenz: $t_{sat} = 10\text{ s}$ $T_I = 10\text{ ms} - 20\text{ s}$ ($N_I = 25$) |
| | <ul style="list-style-type: none"> ● Inhaltsstoffe: <ul style="list-style-type: none"> ○ Schweinehirn-Lysat ○ PBS (Na-K-Phosphat) ● Milieu: <ul style="list-style-type: none"> ○ $pH = 7$ ○ $T = 37^\circ\text{C}$ | <ul style="list-style-type: none"> ● MR-Spektrometer ($B_0 = 14,1\text{ T}$): <ul style="list-style-type: none"> ○ CEST-Spektroskopie: <ul style="list-style-type: none"> ▷ Sättigung: $B_1 = 0,75\text{ }\mu\text{T}$ $t_{sat} = 12\text{ s}$ $t_{rel} = 1\text{ ms}$ $N_{sample} = 161$ ($\Delta\omega_{sample} = \pm 150\text{ ppm}$) ▷ Auswertung: $AREX$ ($\mathcal{L}_{DS} + \mathcal{L}_{MT}$-Fit) $\Delta\omega_{fit} = [-150; -7] \text{ \& } [-0,35; 0,35] \text{ \& } [7; 150] \text{ ppm}$ $AREX_{TPM}(\Delta\omega = 3,6\text{ ppm})$ $\omega_1 = 3,0\text{ ppm} / \omega_2 = 4,5\text{ ppm}$ ○ T_1-Sequenz: $t_{sat} = 15\text{ s}$ $T_I = 10\text{ ms} - 20\text{ s}$ ($N_I = 25$) |
| 5.1 | <ul style="list-style-type: none"> ● Inhaltsstoffe: <ul style="list-style-type: none"> ○ BSA ($c_m = 10\%(\text{w/v})$) ○ PBS (Na-K-Phosphat) ○ Gd-DTPA ($c = 150\text{ }\mu\text{M}$) ● Milieu: <ul style="list-style-type: none"> ○ $pH = 7$ ○ $T = 25^\circ\text{C}$ | <ul style="list-style-type: none"> ● MR-Spektrometer ($B_0 = 14,1\text{ T}$): <ul style="list-style-type: none"> ○ 2D-CEST-Spektroskopie: <ul style="list-style-type: none"> ▷ Sättigung: $B_{1,mean} = 0,45\text{ }\mu\text{T}$ $t_{sat} = 5,5\text{ s}$ $N_{pulse} = 54$ ($t_p = 100\text{ ms}$) $DC = 0,49$ ($t_d = 104\text{ ms}$) $t_{rel} = 1\text{ ms}$ $N_{sample} = 96$ ($\Delta\omega_{sample} = \pm 100\text{ ppm}$) ▷ Auswertung: $AREX$ (2D-\mathcal{L}_{DS}-Fit) $\Delta\omega_{fit} = [-100; -7] \text{ \& } [-0,3; 0,3] \text{ \& } [7; 100] \text{ ppm}$ |

| | | |
|--|--|--|
| | | <ul style="list-style-type: none"> ○ T_I-Sequenz: $t_{sat} = 10\text{ s}$ $T_I = 10\text{ ms} - 20\text{ s } (N_I = 25)$ |
|--|--|--|

Tabelle A.1: Messparameter der erstellten Modelllösungen

| Abb. | Patienten | Messsystem |
|------|--|---|
| 4.24 | <ul style="list-style-type: none"> • neu-diagnostizierte und histologisch bestätigte Glioblastome | <ul style="list-style-type: none"> • Ganzkörper-MR-Tomograph ($B_0 = 7\text{ T}$): <ul style="list-style-type: none"> ◦ CEST-Bildgebung: <ul style="list-style-type: none"> ▷ Sättigung: <ul style="list-style-type: none"> $B_{1,mean} = 0,6\text{ }\mu\text{T}$ $t_{sat} = 3,75\text{ s}$ $N_{pulse} = 150$ ($t_p = 15\text{ ms}$) $DC = 0,6$ ($t_d = 10\text{ ms}$) $t_{rel} = 1\text{ ms}$ $N_{sample} = 65$ ($\Delta\omega_{sample} = \pm 500\text{ ppm}$) ▷ GRE-Bildgebung: <ul style="list-style-type: none"> $nex = 1$ $T_E = 3,76\text{ ms}$ $T_R = 7,6\text{ ms}$ FOV $200 \times 175\text{ mm}^2$ Matrix 128×112 Auflösung $1,56 \times 1,56 \times 5\text{ mm}^3$ ▷ Auswertung: <ul style="list-style-type: none"> AREX (Multi-\mathcal{L}-Fit, ($5\mathcal{L}$)) $\Delta\omega_{\mathcal{L}max,type,i} \approx -3,5 / -2 / 0 / 2,2 / 3,5\text{ ppm}$ ▷ Kontraste <ul style="list-style-type: none"> AREX ($-3,5\text{ ppm}$) $\Delta\omega_{int} = [-3,5; -3,5]\text{ ppm}$ AREX ($3,5\text{ ppm}$) $\Delta\omega_{int} = [3,5; 3,5]\text{ ppm}$ ◦ T_1-Bildgebung: <ul style="list-style-type: none"> $nex = 1$ $T_E = 1,36\text{ ms}$ $T_R = 5,6\text{ s}$ FOV $200 \times 175\text{ mm}^2$ Matrix 128×112 Auflösung $1,56 \times 1,56 \times 5\text{ mm}^3$ $T_I = 0,5 - 5\text{ s}$ ($N_I = 10$) |

Tabelle A.2: Messparameter der Patientenstudie

A.2 Proteine

Im Folgenden sind die Zusammensetzungen der in dieser Arbeit verwendeten Proteine aufgelistet. Eine Identifizierung der Aminosäuren ist anhand des jeweiligen Ein- als auch Drei-Buchstaben-Codes (Abbildung 2.14) möglich. Die Aminosäuren wurden dabei nach der jeweiligen chemischen Gruppe sortiert, die als charakteristisches Signal in der CEST-Spektroskopie detektierbar ist.

Bovine Serum Albumin (BSA)

| Aminosäure | Anzahl | Rel. Häufigkeit [%] | besondere chem. Gruppen |
|------------|--------|---------------------|--|
| Gly (G) | 16 | 2,7 | aliph. CH _x |
| Ala (A) | 46 | 7,9 | aliph. CH _x |
| Val (V) | 36 | 6,2 | aliph. CH _x |
| Leu (L) | 61 | 10,5 | aliph. CH _x |
| Ile (I) | 14 | 2,4 | aliph. CH _x |
| Met (M) | 4 | 0,7 | aliph. CH _x |
| Ser (S) | 28 | 4,8 | aliph. CH _x |
| Thr (T) | 34 | 5,8 | aliph. CH _x |
| Cys (C) | 35 | 6,0 | aliph. CH _x |
| Asp (D) | 40 | 6,9 | aliph. CH _x |
| Glu (E) | 59 | 10,1 | aliph. CH _x |
| Pro (P) | 28 | 4,8 | aliph. CH _x |
| Tyr (Y) | 20 | 3,4 | arom. CH _x |
| Trp (W) | 2 | 0,3 | arom. CH _x |
| Phe (F) | 27 | 4,6 | arom. CH _x |
| His (H) | 17 | 2,9 | arom. CH _x |
| Asn (N) | 14 | 2,4 | CONH ₂ |
| Gln (Q) | 20 | 3,4 | CONH ₂ |
| Lys (K) | 59 | 10,1 | NH ₃ ⁺ |
| Arg (R) | 23 | 3,9 | (NH ₂) ₂ ⁺ |

Tabelle A.3: Zusammensetzung der insgesamt 583 Aminosäuren in BSA, mit einer molaren Masse von 66,46kDa.

Huntingtin (HTT)-Protein

| Aminosäure | Anzahl | Rel. Häufigkeit [%] | besondere chem. Gruppen |
|------------|--------|---------------------|--|
| Gly (G) | 1 | 0,9 | aliph. CH _x |
| Ala (A) | 5 | 4,3 | aliph. CH _x |
| Val (V) | 1 | 0,9 | aliph. CH _x |
| Leu (L) | 7 | 6,0 | aliph. CH _x |
| Ile (I) | 0 | 0,0 | aliph. CH _x |
| Met (M) | 2 | 1,7 | aliph. CH _x |
| Ser (S) | 2 | 1,7 | aliph. CH _x |
| Thr (T) | 1 | 0,9 | aliph. CH _x |
| Cys (C) | 0 | 0,0 | aliph. CH _x |
| Asp (D) | 0 | 0,0 | aliph. CH _x |
| Glu (E) | 4 | 3,4 | aliph. CH _x |
| Pro (P) | 31 | 26,7 | aliph. CH _x |
| Tyr (Y) | 0 | 0,0 | arom. CH _x |
| Trp (W) | 0 | 0,0 | arom. CH _x |
| Phe (F) | 2 | 1,7 | arom. CH _x |
| His (H) | 1 | 0,9 | arom. CH _x |
| Asn (N) | 0 | 0,0 | CONH ₂ |
| Gln (Q) | 55 | 47,4 | CONH ₂ |
| Lys (K) | 3 | 2,6 | NH ₃ ⁺ |
| Arg (R) | 1 | 0,9 | (NH ₂) ₂ ⁺ |

Tabelle A.4: Zusammensetzung der insgesamt 116 Aminosäuren im HTT-Protein, mit einer molaren Masse von 13,41 kDa.

Glutathion-S-Transferase (GST)

| Aminosäure | Anzahl | Rel. Häufigkeit [%] | besondere chem. Gruppen |
|------------|--------|---------------------|--|
| Gly (G) | 17 | 7,0 | aliph. CH _x |
| Ala (A) | 10 | 4,1 | aliph. CH _x |
| Val (V) | 10 | 4,1 | aliph. CH _x |
| Leu (L) | 31 | 12,7 | aliph. CH _x |
| Ile (I) | 13 | 5,3 | aliph. CH _x |
| Met (M) | 9 | 3,7 | aliph. CH _x |
| Ser (S) | 10 | 4,1 | aliph. CH _x |
| Thr (T) | 6 | 2,5 | aliph. CH _x |
| Cys (C) | 4 | 1,6 | aliph. CH _x |
| Asp (D) | 19 | 7,8 | aliph. CH _x |
| Glu (E) | 19 | 7,8 | aliph. CH _x |
| Pro (P) | 17 | 7,0 | aliph. CH _x |
| Tyr (Y) | 14 | 5,7 | arom. CH _x |
| Trp (W) | 4 | 1,6 | arom. CH _x |
| Phe (F) | 11 | 4,5 | arom. CH _x |
| His (H) | 7 | 2,9 | arom. CH _x |
| Asn (N) | 4 | 1,6 | CONH ₂ |
| Gln (Q) | 6 | 2,5 | CONH ₂ |
| Lys (K) | 21 | 8,6 | NH ₃ ⁺ |
| Arg (R) | 12 | 4,9 | (NH ₂) ₂ ⁺ |

Tabelle A.5: Zusammensetzung der insgesamt 244 Aminosäuren im GST, mit einer molaren Masse von 28,43 kDa.

β -Amyloid A β 42

| Aminosäure | Anzahl | Rel. Häufigkeit [%] | besondere chem. Gruppen |
|------------|--------|---------------------|--|
| Gly (G) | 6 | 14,3 | aliph. CH _x |
| Ala (A) | 4 | 9,5 | aliph. CH _x |
| Val (V) | 6 | 14,3 | aliph. CH _x |
| Leu (L) | 2 | 4,8 | aliph. CH _x |
| Ile (I) | 3 | 7,1 | aliph. CH _x |
| Met (M) | 1 | 2,4 | aliph. CH _x |
| Ser (S) | 2 | 4,8 | aliph. CH _x |
| Thr (T) | 0 | 0,0 | aliph. CH _x |
| Cys (C) | 0 | 0,0 | aliph. CH _x |
| Asp (D) | 3 | 7,1 | aliph. CH _x |
| Glu (E) | 3 | 7,1 | aliph. CH _x |
| Pro (P) | 0 | 0,0 | aliph. CH _x |
| Tyr (Y) | 1 | 2,4 | arom. CH _x |
| Trp (W) | 0 | 0,0 | arom. CH _x |
| Phe (F) | 3 | 7,1 | arom. CH _x |
| His (H) | 3 | 7,1 | arom. CH _x |
| Asn (N) | 1 | 2,4 | CONH ₂ |
| Gln (Q) | 1 | 2,4 | CONH ₂ |
| Lys (K) | 2 | 4,8 | NH ₃ ⁺ |
| Arg (R) | 1 | 2,4 | (NH ₂) ₂ ⁺ |

Tabelle A.6: Zusammensetzung der insgesamt 42 Aminosäuren im β -Amyloid A β 42, mit einer molaren Masse von 4,51 kDa.

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------|---|----|
| 2.1 | Energiezustände der Zeeman-Aufspaltung | 6 |
| 2.2 | Dynamik des Magnetisierungsvektor bei on-resonanter RF-Einstrahlung | 8 |
| 2.3 | Fourier-Transformation des FID | 10 |
| 2.4 | Austauschrate k_{sw} verschiedener funktioneller Gruppen in Aminosäuren als Funktion des pH | 12 |
| 2.5 | Energieniveaus eines dipolar gekoppelten 2-Spin-Systems im externen Magnetfeld | 14 |
| 2.6 | Kreuzrelaxationsrate σ als Funktion der Korrelationszeit τ_c | 15 |
| 2.7 | Illustration von <i>exchange-relayed NOEs</i> (rNOE) | 16 |
| 2.8 | Illustration des <i>semi-solid Magnetization Transfer</i> (ssMT) | 18 |
| 2.9 | Illustration der CEST-Pulssequenz | 19 |
| 2.10 | CEST-Bildgebung | 20 |
| 2.11 | Exemplarisches <i>in vivo</i> Z-Spektrum | 21 |
| 2.12 | Illustration des effektiven magnetischen Feldes im rotierenden Koordinatensystem und die Trajektorie der Wassermagnetisierung unter RF-Einstrahlung | 23 |
| 2.13 | Die Sättigungseffizienz α | 25 |
| 2.14 | Die 20 verschiedenen Aminosäuren | 30 |
| 2.15 | Illustration der Strukturebenen von Proteinen | 31 |
| 2.16 | Die charakteristischen Bereiche im NMR-Spektrum bestimmter chemischer Gruppen in Proteinen | 33 |
| 3.1 | NMR-Spektrometer am DKFZ mit $B_0 = 14,1$ T | 35 |
| 3.2 | Ganzkörper-MR-Tomograph am DKFZ mit $B_0 = 7$ T | 36 |
| 3.3 | Pulssequenz der CEST-Spektroskopie | 37 |
| 3.4 | Pulssequenz der CEST-Bildgebung | 38 |
| 3.5 | Exemplarische AREX-Auswertung eines Z-Spektrums | 41 |
| 3.6 | Graphische Darstellung der Drei-Punkt-Methode | 42 |
| 3.7 | Multi-Lorentz-Fit eines Z-Spektrums | 43 |
| 3.8 | WEX-Signal als Funktion der Mischungszeit T_M | 45 |
| 3.9 | Entfaltung von BSA mittels SDS | 48 |
| 3.10 | Elektronenmikroskopische (EM) Aufnahme einer intakten Hefezelle | 50 |
| 3.11 | Der BeadBeater zur Herstellung von Hefezellen-Lysaten | 51 |
| 3.12 | Konstruktion zur Extraktion der Glaskügelchen bei der Lysat-Herstellung | 52 |
| 3.13 | Dounce-Homogenisator für den Zellaufschluss von Tiergewebe | 54 |
| 4.1 | Überprüfung der AREX-Methode für rNOE-Signale | 56 |
| 4.2 | Einfluss der Protein-Entfaltung auf die AREX-Spektren von BSA | 57 |
| 4.3 | AREX- und FL-Denaturierungskurven von BSA bei Zugabe von SDS | 58 |
| 4.4 | Pearson-Korrelationsanalyse der AREX- und FL-Denaturierungskurven | 59 |
| 4.5 | AREX-Signale von BSA bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen | 61 |
| 4.6 | WEX-Signale von BSA bei verschiedenen pH-Werten | 62 |

| | | |
|------|---|----|
| 4.7 | Die Signatur der Protein-Entfaltung dargestellt als MRT-Kontrast | 63 |
| 4.8 | Quantitative Bestimmung von k_{sw} und f_s der Amin-Protonen in BSA | 64 |
| 4.9 | Quantitative Bestimmung von k_{sw} und f_s aliphatischer und aromatischer Protonen in BSA | 65 |
| 4.10 | Z-Spektren von HTT-Proteinen | 67 |
| 4.11 | AREX-Spektren von HTT-Proteinen unter Aggregation | 68 |
| 4.12 | Z-Spektren und AREX-Spektren von β -Amyloiden unter Aggregation | 69 |
| 4.13 | Zeitlicher Verlauf der AREX-Spektren von β -Amyloiden unter Aggregation | 70 |
| 4.14 | AREX-Denaturierungskurven von β -Amyloiden | 71 |
| 4.15 | CEST-Effekte intakter Hefezellen | 72 |
| 4.16 | Z-Spektroskopie einzelner Kompartimente lysierter Hefezellen | 74 |
| 4.17 | AREX-Spektren des Hefezellen-Lysats bei verschiedenen pH und Temperaturen | 75 |
| 4.18 | CEST-Signaländerungen der einzelnen Kompartimente von lysierten Hefezellen unter Hitzeschock | 76 |
| 4.19 | AREX-Spektren des Hitze-geschockten Hefezellen-Lysats nach Zentrifugation | 76 |
| 4.20 | Denaturierung des Hefezellen-Lysats mittels SDS | 77 |
| 4.21 | AREX- und FL-Denaturierungskurven des Hefezellen-Lysats bei Zugabe von SDS | 78 |
| 4.22 | DPC der Protein-Entfaltung in BSA-Modelllösungen | 80 |
| 4.23 | Das Verhältnis r_{rNOE} von rNOE-Signalen aromatischer und aliphatischer Protonen in verschiedenen Modelllösungen | 82 |
| 4.24 | DPC neu-diagnostizierter Glioblastome in Patienten | 84 |
| 5.1 | 2D-CEST-Spektroskopie von BSA | 96 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-----|---|-----|
| 4.1 | Kompartimente nach der Lyse von Hefezellen | 73 |
| A.1 | Messparameter der erstellten Modelllösungen | 111 |
| A.2 | Messparameter der Patientenstudie | 112 |
| A.3 | Zusammensetzung von BSA | 113 |
| A.4 | Zusammensetzung des HTT-Protein | 114 |
| A.5 | Zusammensetzung des GST | 115 |
| A.6 | Zusammensetzung des β -Amyloid A β 42 | 116 |

Literaturverzeichnis

- [Abergel und Palmer 2004] ABERGEL, Daniel ; PALMER, Arthur G.: Approximate Solutions of the Bloch–McConnell Equations for Two-Site Chemical Exchange. In: *ChemPhysChem* 5 (2004), S. 787–793
- [Atkins und Paula 2006] ATKINS, P. W. ; PAULA, Julio d.: *Physikalische Chemie*. 4. Auflage. Weinheim, Deutschland : WILEY-VCH, 2006
- [BioSpec 2015] BIOSPEC: *BioSpec Products - BeadBeater Instructions*. 2015. – URL <http://www.biospec.com/instructions/beadbeater/>
- [Bloch u. a. 1946] BLOCH, F. ; HANSEN, W. W. ; PACKARD, Martin: Nuclear Induction. In: *Physical Review* 69 (1946), S. 127–127
- [Bodet u. a. 2015] BODET, Olga ; GOERKE, Steffen ; BEHL, Nicolas G. R. ; ROELOFFS, Volkert ; ZAISS, Moritz ; BACHERT, Peter: Amide proton transfer of carnosine in aqueous solution studied in vitro by WEX and CEST experiments. In: *NMR in Biomedicine* 28 (2015), S. 1097–1103
- [Cai u. a. 2012] CAI, Kejia ; HARIS, Mohammad ; SINGH, Anup ; KOGAN, Feliks ; GREENBERG, Joel H. ; HARIHARAN, Hari ; DETRE, John A. ; REDDY, Ravinder: Magnetic resonance imaging of glutamate. In: *Nature Medicine* 18 (2012), S. 302–307
- [Chen u. a. 2015] CHEN, Liu Q. ; PAGEL, Mark D. ; CHEN, Liu Q. ; PAGEL, Mark D.: Evaluating pH in the Extracellular Tumor Microenvironment Using CEST MRI and Other Imaging Methods, Evaluating pH in the Extracellular Tumor Microenvironment Using CEST MRI and Other Imaging Methods. In: *Advances in Radiology, Advances in Radiology* Article ID 206405 (2015)
- [Desmond u. a. 2013] DESMOND, Kimberly L. ; MOOSVI, Firas ; STANISZ, Greg J.: Mapping of Amide, Amine, and Aliphatic Peaks in the CEST Spectra of Murine Xenografts at 7 T. In: *Magnetic Resonance in Medicine* 71 (2013), S. 1841–1853
- [Dixon u. a. 2010] DIXON, W. T. ; REN, Jimin ; LUBAG, Angelo J. M. ; RATNAKAR, James ; VINOGRADOV, Elena ; HANCU, Ileana ; LENKINSKI, Robert E. ; SHERRY, A. D.: A Concentration-Independent Method to Measure Exchange Rates in PARACEST Agents. In: *Magnetic Resonance in Medicine* 63 (2010), S. 625–632
- [Freeman 2005] FREEMAN, Scott: *Biological Science*. 2nd edition. Upper Saddle River, NJ, USA : Pearson Prentice Hall, 2005
- [Friedman u. a. 2015] FRIEDMAN, Joshua I. ; XIA, Ding ; REGATTE, Ravinder R. ; JERSCHOW, Alexej: Transfer Rate Edited experiment for the selective detection of Chemical Exchange via Saturation Transfer (TRE-CEST). In: *Journal of Magnetic Resonance* 256 (2015), S. 43–51

- [Gillies u. a. 2004] GILLIES, R.J. ; RAGHUNAND, N. ; GARCIA-MARTIN, M.L. ; GATENBY, R.A.: pH imaging. In: *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine* 23 (2004), S. 57–64
- [Goerke 2012] GOERKE, Steffen: *Water-Exchange (WEX)-1H-NMR-Spektroskopie an Kreatin-Modell-Loesungen*. Fakultät für Physik und Astronomie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Diplomarbeit, 2012
- [Goerke u. a. 2014] GOERKE, Steffen ; ZAISS, Moritz ; BACHERT, Peter: Characterization of creatine guanidinium proton exchange by water-exchange (WEX) spectroscopy for absolute-pH CEST imaging in vitro. In: *NMR in Biomedicine* 27 (2014), S. 507–518
- [Goerke u. a. 2015a] GOERKE, Steffen ; ZAISS, Moritz ; KUNZ, Patrick ; KLIKA, Karel D. ; WINDSCHUH, Johannes D. ; MOGK, Axel ; BUKAU, Bernd ; LADD, Mark E. ; BACHERT, Peter: Signature of protein unfolding in chemical exchange saturation transfer imaging. In: *NMR in Biomedicine* 28 (2015), S. 906–913
- [Goerke u. a. 2015b] GOERKE, Steffen ; ZAISS, Moritz ; WINDSCHUH, Johannes ; KLIKA, Karel D. ; BACHERT, Peter: Two dimensional CEST spectroscopy of proteins. In: *Proceedings of the Symposium on Chemical Exchange Saturation Transfer PENN-CEST, Philadelphia, PA, USA* (2015), Under Review
- [Graaf 2008] GRAAF, Robin A. d.: *In Vivo NMR Spectroscopy: Principles and Techniques*. 2nd edition. Chichester, England : John Wiley & Sons, 2008
- [Guo u. a. 1990] GUO, X. H. ; ZHAO, N. M. ; CHEN, S. H. ; TEIXEIRA, J.: Small-angle neutron scattering study of the structure of protein / detergent complexes. In: *Biopolymers* 29 (1990), S. 335–346
- [Haacke u. a. 1999] HAACKE, E. M. ; BROWN, Robert W. ; THOMPSON, Michael R. ; VENKATESAN, Ramesh: *Magnetic Resonance Imaging: Physical Principles and Sequence Design*. 1st edition. New York, NY, USA : John Wiley & Sons, 1999
- [Haris u. a. 2012] HARIS, Mohammad ; NANGA, Ravi Prakash R. ; SINGH, Anup ; CAI, Kejia ; KOGAN, Feliks ; HARIHARAN, Hari ; REDDY, Ravinder: Exchange rates of creatine kinase metabolites: feasibility of imaging creatine by chemical exchange saturation transfer MRI. In: *NMR in Biomedicine* 25 (2012), S. 1305–1309
- [Haris u. a. 2013] HARIS, Mohammad ; NATH, Kavindra ; CAI, Kejia ; SINGH, Anup ; CRESCENZI, Rachelle ; KOGAN, Feliks ; VERMA, Gaurav ; REDDY, Sanjana ; HARIHARAN, Hari ; MELHEM, Elias R. ; REDDY, Ravinder: Imaging of glutamate neurotransmitter alterations in Alzheimer’s disease. In: *NMR in Biomedicine* 26 (2013), S. 386–391
- [Henkelman u. a. 2001] HENKELMAN, R. M. ; STANISZ, G. J. ; GRAHAM, S. J.: Magnetization transfer in MRI: a review. In: *NMR in Biomedicine* 14 (2001), S. 57–64
- [Jin und Kim 2013] JIN, Tao ; KIM, Seong-Gi: In vivo saturation transfer imaging of nuclear Overhauser effect from aromatic and aliphatic protons: implication to APT quantification. In: *Proceedings of the 21th Annual Meeting ISMRM, Salt Lake City, UT, USA* (2013), Nr. 2528

- [Jin u. a. 2012] JIN, Tao ; WANG, Ping ; ZONG, Xiaopeng ; KIM, Seong-Gi: Magnetic resonance imaging of the Amine-Proton EXchange (APEX) dependent contrast. In: *Neuroimage* 59 (2012), S. 1218–1227
- [Jin u. a. 2013] JIN, Tao ; WANG, Ping ; ZONG, Xiaopeng ; KIM, Seong-Gi: MR Imaging of the Amide-Proton Transfer Effect and the pH-Insensitive Nuclear Overhauser Effect at 9.4 T. In: *Magnetic Resonance in Medicine* 69 (2013), S. 760–770
- [Jones u. a. 2013] JONES, Craig K. ; HUANG, Alan ; XU, Jiadi ; EDDEN, Richard A. ; SCHAEER, Michael ; HUA, Jun ; OSKOLKOV, Nikita ; ZACA, Domenico ; ZHOU, Jinyuan ; MCMAHON, Michael T. ; PILLAI, Jay J. ; ZIJL, Peter C. M. van: Nuclear Overhauser enhancement (NOE) imaging in the human brain at 7T. In: *NeuroImage* 77 (2013), S. 114–124
- [Kato u. a. 2013] KATO, Yasumasa ; OZAWA, Shigeyuki ; MIYAMOTO, Chihiro ; MAEHATA, Yojiro ; SUZUKI, Atsuko ; MAEDA, Toyonobu ; BABA, Yuh: Acidic extracellular microenvironment and cancer. In: *Cancer Cell International* 13 (2013), S. 89
- [Kim u. a. 2009] KIM, Mina ; GILLEN, Joseph ; LANDMAN, Bennett A. ; ZHOU, Jinyuan ; ZIJL, Peter C. M. van: Water saturation shift referencing (WASSR) for chemical exchange saturation transfer (CEST) experiments. In: *Magnetic resonance in medicine* 61 (2009), S. 1441–1450
- [Kirsch und Hull 2008] KIRSCH, Stefan ; HULL, William E.: Quantitative time- and frequency-domain analysis of the two-pulse COSY revamped by asymmetric Z-gradient echo detection NMR experiment: Theoretical and experimental aspects, time-zero data truncation artifacts, and radiation damping. In: *The Journal of Chemical Physics* 129 (2008), S. 044505
- [Lauterbur 1973] LAUTERBUR, P. C.: Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance. In: *Nature* 242 (1973), S. 190–191
- [Liepinsh und Otting 1996] LIEPINSH, Edvards ; OTTING, Gottfried: Proton exchange rates from amino acid side chains— implications for image contrast. In: *Magnetic Resonance in Medicine* 35 (1996), S. 30–42
- [Liu u. a. 2013] LIU, Dapeng ; ZHOU, Jinyuan ; XUE, Rong ; ZUO, Zhentao ; AN, Jing ; WANG, Danny J. J.: Quantitative characterization of nuclear overhauser enhancement and amide proton transfer effects in the human brain at 7 tesla. In: *Magnetic Resonance in Medicine* 70 (2013), S. 1070–1081
- [Longo u. a. 2014] LONGO, Dario L. ; GREGORIO, Enza D. ; ABATEGIOVANNI, Riccardo ; CECCON, Alberto ; ASSFALG, Michael ; MOLINARI, Henriette ; AIME, Silvio: Chemical exchange saturation transfer (CEST): an efficient tool for detecting molecular information on proteins' behaviour. In: *Analyst* 139 (2014), S. 2687–2690
- [Lu u. a. 2015] LU, Jianhua ; ZHOU, Jinyuan ; CAI, Congbo ; CAI, Shuhui ; CHEN, Zhong: Observation of true and pseudo NOE signals using CEST-MRI and CEST-MRS sequences with and without lipid suppression. In: *Magnetic Resonance in Medicine* 73 (2015), S. 1615–1622
- [Mangia u. a. 2009] MANGIA, Silvia ; LIIMATAINEN, Timo ; GARWOOD, Michael ; MICHAELI, Shalom: Rotating frame relaxation during adiabatic pulses vs. conventional spin

- lock: simulations and experimental results at 4 T. In: *Magnetic Resonance Imaging* 27 (2009), S. 1074–1087
- [McConnell 1958] MCCONNELL, Harden M.: Reaction Rates by Nuclear Magnetic Resonance. In: *The Journal of Chemical Physics* 28 (1958), S. 430–431
- [Meissner u. a. 2015] MEISSNER, Jan-Eric ; GOERKE, Steffen ; RERICH, Eugenia ; KLIKA, Karel D. ; RADBRUCH, Alexander ; LADD, Mark E. ; BACHERT, Peter ; ZAISS, Moritz: Quantitative pulsed CEST-MRI using Omega-plots. In: *NMR in Biomedicine* (2015), DOI: 10.1002/nbm.3362
- [Michal Jazwinski 1990] MICHAL JAZWINSKI, S.: [13] Preparation of extracts from yeast. In: DEUTSCHER, Murray P. (Hrsg.): *Methods in Enzymology* Bd. 182. Academic Press, 1990, S. 154–174
- [Milde 2015] MILDE, Katharina: *Study of protein denaturation in yeast cell lysates with ¹H NMR CEST spectroscopy*. Fakultät fuer Physik und Astronomie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Bachelorarbeit, 2015
- [Mori u. a. 1996a] MORI, S ; ABEYGUNAWARDANA, C ; ZIJL, P C M. van ; BERG, J M.: Water exchange filter with improved sensitivity (WEX II) to study solvent-exchangeable protons. Application to the consensus zinc finger peptide CP-1. In: *Journal of magnetic resonance. Series B* 110 (1996), S. 96–101
- [Mori u. a. 1996b] MORI, S ; BERG, J M. ; ZIJL, P C. van: Separation of intramolecular NOE and exchange peaks in water exchange spectroscopy using spin-echo filters. In: *Journal of biomolecular NMR* 7 (1996), S. 77–82
- [Mori u. a. 1997] MORI, Susumu ; ABEYGUNAWARDANA, Chitrananda ; BERG, Jeremy M. ; ZIJL, Peter C. M. van: NMR Study of Rapidly Exchanging Backbone Amide Protons in Staphylococcal Nuclease and the Correlation with Structural and Dynamic Properties. In: *Journal of the American Chemical Society* 119 (1997), S. 6844–6852
- [Mori u. a. 1994] MORI, Susumu ; JOHNSON, Mark O. ; BERG, Jeremy M. ; ZIJL, Peter C. M. van: Water Exchange Filter (WEX Filter) for Nuclear Magnetic Resonance Studies of Macromolecules. In: *Journal of the American Chemical Society* 116 (1994), S. 11982–11984
- [Murase 2012] MURASE, Kenya: Behavior of the magnetization in spin-locking magnetic resonance imaging using numerical solutions to the time-dependent Bloch equations. In: *Physics in Medicine and Biology* 57 (2012), S. N481–N492
- [Neuhaus und Williamson 1989] NEUHAUS, David ; WILLIAMSON, Michael P.: *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*. 1st edition. New York, NY, USA : Wiley-VCH, 1989
- [Paech u. a. 2014] PAECH, Daniel ; ZAISS, Moritz ; MEISSNER, Jan-Eric ; WINDSCHUH, Johannes ; WIESTLER, Benedikt ; BACHERT, Peter ; NEUMANN, Jan O. ; KICKINGEREDER, Philipp ; SCHLEMMER, Heinz-Peter ; WICK, Wolfgang ; NAGEL, Armin M. ; HEILAND, Sabine ; LADD, Mark E. ; BENDSZUS, Martin ; RADBRUCH, Alexander: Nuclear Overhauser Enhancement Mediated Chemical Exchange Saturation Transfer Imaging at 7 Tesla in Glioblastoma Patients. In: *PLoS ONE* 9 (2014), S. e104181

- [Parsell u. a. 1993] PARSELL, Dawn A. ; TAULIEN, John ; LINDQUIST, Susan ; VIITANEN, P. ; JAENICKE, R. ; HORWICH, A. ; HARTL, F.-U. ; ELLIS, R. J. ; WELCH, W. J.: The Role of Heat-Shock Proteins in Thermotolerance [and Discussion]. In: *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 339 (1993), S. 279–286
- [Proctor und Yu 1950] PROCTOR, W. G. ; YU, F. C.: The Dependence of a Nuclear Magnetic Resonance Frequency upon Chemical Compound. In: *Physical Review* 77 (1950), S. 717–717
- [Purcell u. a. 1946] PURCELL, E. M. ; TORREY, H. C. ; POUND, R. V.: Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. In: *Physical Review* 69 (1946), S. 37–38
- [Raghuuand u. a. 1999] RAGHUNAND, Natarajan ; ALTBACH, Maria I. ; SLUIS, Robert van ; BAGGETT, Brenda ; TAYLOR, Charles W. ; BHUJWALLA, Zaver M. ; GILLIES, Robert J.: Plasmalemmal pH-gradients in drug-sensitive and drug-resistant MCF-7 human breast carcinoma xenografts measured by ³¹P magnetic resonance spectroscopy. In: *Biochemical Pharmacology* 57 (1999), S. 309–312
- [Roeloffs u. a. 2015] ROELOFFS, Volkert ; MEYER, Christian ; BACHERT, Peter ; ZAISS, Moritz: Towards quantification of pulsed spinlock and CEST at clinical MR scanners: an analytical interleaved saturation–relaxation (ISAR) approach. In: *NMR in Biomedicine* 28 (2015), S. 40–53
- [Ross und Poirier 2004] ROSS, Christopher A. ; POIRIER, Michelle A.: Protein aggregation and neurodegenerative disease. In: *Neurodegeneration* 10 (2004), S. 10–17
- [Salhany u. a. 1975] SALHANY, J. M. ; YAMANE, T. ; SHULMAN, R. G. ; OGAWA, S.: High resolution ³¹P nuclear magnetic resonance studies of intact yeast cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72 (1975), S. 4966–4970
- [Sanchez u. a. 1992] SANCHEZ, Y ; TAULIEN, J ; BORKOVICH, K A. ; LINDQUIST, S: Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. In: *The EMBO Journal* 11 (1992), S. 2357–2364
- [Skinner u. a. 2012a] SKINNER, John J. ; LIM, Woon K. ; BÉDARD, Sabrina ; BLACK, Ben E. ; ENGLANDER, S. W.: Protein dynamics viewed by hydrogen exchange. In: *Protein Science* 21 (2012), S. 996–1005
- [Skinner u. a. 2012b] SKINNER, John J. ; LIM, Woon K. ; BÉDARD, Sabrina ; BLACK, Ben E. ; ENGLANDER, S. W.: Protein hydrogen exchange: Testing current models. In: *Protein Science* 21 (2012), S. 987–995
- [Solomon 1955] SOLOMON, I.: Relaxation Processes in a System of Two Spins. In: *Physical Review* 99 (1955), S. 559–565
- [Stanisz u. a. 2005] STANISZ, Greg J. ; ODROBINA, Ewa E. ; PUN, Joseph ; ESCARAVAGE, Michael ; GRAHAM, Simon J. ; BRONSKILL, Michael J. ; HENKELMAN, R. M.: T1, T2 relaxation and magnetization transfer in tissue at 3T. In: *Magnetic Resonance in Medicine* 54 (2005), S. 507–512
- [Stryer 1996] STRYER, Lubert: *Biochemie*. 4. Auflage. Heidelberg, Deutschland : Spektrum Akademischer Verlag, 1996

- [Sun u. a. 2008] SUN, Phillip Z. ; BENNER, Thomas ; KUMAR, Ashok ; SORENSEN, A. G.: Investigation of optimizing and translating pH-sensitive pulsed-chemical exchange saturation transfer (CEST) imaging to a 3T clinical scanner. In: *Magn Reson Med* 60 (2008), S. 834–841
- [Sun u. a. 2007a] SUN, Phillip Z. ; FARRAR, Christian T. ; SORENSEN, A G.: Correction for artifacts induced by B(0) and B(1) field inhomogeneities in pH-sensitive chemical exchange saturation transfer (CEST) imaging. In: *Magnetic Resonance in Medicine* 58 (2007), S. 1207–1215
- [Sun u. a. 2011] SUN, Phillip Z. ; WANG, Enfeng ; CHEUNG, Jerry S. ; ZHANG, Xiaoan ; BENNER, Thomas ; SORENSEN, A. G.: Simulation and optimization of pulsed radio frequency irradiation scheme for chemical exchange saturation transfer (CEST) MRI-demonstration of pH-weighted pulsed-amide proton CEST MRI in an animal model of acute cerebral ischemia. In: *Magnetic Resonance in Medicine* 66 (2011), S. 1042–1048
- [Sun u. a. 2007b] SUN, Phillip Z. ; ZHOU, Jinyuan ; HUANG, Judy ; ZIJL, Peter van: Simplified quantitative description of amide proton transfer (APT) imaging during acute ischemia. In: *Magnetic Resonance in Medicine* 57 (2007), S. 405–410
- [Tiidus u. a. 2012] TIIDUS, Peter ; TUPLING, A. R. ; HOUSTON, Michael: *Biochemistry Primer for Exercise Science*. 4th edition. Champaign, IL, USA : Human Kinetics, 2012
- [Tropp 2008] TROPP, Burton E.: *Molecular Biology: Genes to Proteins*. 3rd edition. Burlington, MA, USA : Jones & Bartlett Learning, 2008
- [Trott und Palmer III 2002] TROTT, Oleg ; PALMER III, Arthur G.: R1 Relaxation outside of the Fast-Exchange Limit. In: *Journal of Magnetic Resonance* 154 (2002), S. 157–160
- [Trott und Palmer III 2004] TROTT, Oleg ; PALMER III, Arthur G.: Theoretical study of R1 rotating-frame and R2 free-precession relaxation in the presence of n-site chemical exchange. In: *Journal of Magnetic Resonance* 170 (2004), S. 104–112
- [Turro u. a. 1995] TURRO, Nicholas J. ; LEI, Xue-Gong ; ANANTHAPADMANABHAN, K. P. ; ARONSON, M.: Spectroscopic Probe Analysis of Protein-Surfactant Interactions: The BSA/SDS System. In: *Langmuir* 11 (1995), S. 2525–2533
- [Ward u. a. 2000] WARD, K.M ; ALETRAS, A.H ; BALABAN, R.S: A New Class of Contrast Agents for MRI Based on Proton Chemical Exchange Dependent Saturation Transfer (CEST). In: *Journal of Magnetic Resonance* 143 (2000), S. 79–87
- [Windschuh u. a. 2015a] WINDSCHUH, Johannes ; GOERKE, Steffen ; MEISSNER, Jan-Eric ; RADBRUCH, Alexander ; BACHERT, Peter ; ZAISS, Moritz: Isolated Amide Proton CEST Contrast at 7 T Correlates with Contrast-enhanced T1-weighted Images of Tumor Patients. In: *Proceedings of the 23rd Annual Scientific Meeting ISMRM, Toronto, Canada* (2015), Nr. 1773
- [Windschuh u. a. 2015b] WINDSCHUH, Johannes ; GOERKE, Steffen ; MEISSNER, Jan-Eric ; RADBRUCH, Alexander ; BACHERT, Peter ; ZAISS, Moritz: Isolated Amide Proton CEST Contrast at 7T Correlates with Contrast-Enhanced T1w-Images of Tumor Patients. In: *Proceedings of the 56th Annual Scientific Meeting ENC, Pacific Grove, USA* (2015), Nr. ThOA

- [Windschuh u. a. 2015c] WINDSCHUH, Johannes ; ZAISS, Moritz ; MEISSNER, Jan-Eric ; PAECH, Daniel ; RADBRUCH, Alexander ; LADD, Mark E. ; BACHERT, Peter: Correction of B1-inhomogeneities for relaxation-compensated CEST imaging at 7T. In: *NMR in Biomedicine* 28 (2015), S. 529–537
- [Wolff und Balaban 1990] WOLFF, Steven D. ; BALABAN, Robert S.: NMR imaging of labile proton exchange. In: *Journal of Magnetic Resonance (1969)* 86 (1990), S. 164–169
- [Wuethrich 1986] WUETHRICH, Kurt: *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. 1st edition. New York, NY, USA : John Wiley & Sons, 1986
- [Xu u. a. 2014a] XU, Jiadi ; YADAV, Nirbhay N. ; BAR-SHIR, Amnon ; JONES, Craig K. ; CHAN, Kannie W. Y. ; ZHANG, Jiangyang ; WALCZAK, P. ; MCMAHON, Michael T. ; ZIJL, Peter C. M. van: Variable Delay Multi-Pulse Train for Fast Chemical Exchange Saturation Transfer and Relayed-Nuclear Overhauser Enhancement MRI. In: *Magnetic Resonance in Medicine* 71 (2014), S. 1798–1812
- [Xu u. a. 2014b] XU, Junzhong ; ZAISS, Moritz ; ZU, Zhongliang ; LI, Hua ; XIE, Jingping ; GOCHBERG, Daniel F. ; BACHERT, Peter ; GORE, John C.: On the origins of chemical exchange saturation transfer (CEST) contrast in tumors at 9.4 T. In: *NMR in Biomedicine* 27 (2014), S. 406–416
- [Zaiss und Bachert 2013a] ZAISS, Moritz ; BACHERT, Peter: Chemical exchange saturation transfer (CEST) and MR Z-spectroscopy in vivo: a review of theoretical approaches and methods. In: *Physics in Medicine and Biology* 58 (2013), S. R221–R269
- [Zaiss und Bachert 2013b] ZAISS, Moritz ; BACHERT, Peter: Exchange-dependent relaxation in the rotating frame for slow and intermediate exchange – modeling off-resonant spin-lock and chemical exchange saturation transfer. In: *NMR in Biomedicine* 26 (2013), S. 507–518
- [Zaiss u. a. 2013] ZAISS, Moritz ; KUNZ, Patrick ; GOERKE, Steffen ; RADBRUCH, Alexander ; BACHERT, Peter: MR imaging of protein folding in vitro employing Nuclear-Overhauser-mediated saturation transfer. In: *NMR in Biomedicine* 26 (2013), S. 1815–1822
- [Zaiss u. a. 2015a] ZAISS, Moritz ; WINDSCHUH, Johannes ; PAECH, Daniel ; MEISSNER, Jan-Eric ; BURTH, Sina ; SCHMITT, Benjamin ; KICKINGEREDER, Philip ; WIESTLER, Benedikt ; WICK, Wolfgang ; BENDSZUS, Martin ; SCHLEMMER, Heinz-Peter ; LADD, Mark E. ; BACHERT, Peter ; RADBRUCH, Alexander: Relaxation-compensated CEST-MRI of the human brain at 7T: Unbiased insight into NOE and amide signal changes in human glioblastoma. In: *NeuroImage* 112 (2015), S. 180–188
- [Zaiss u. a. 2014] ZAISS, Moritz ; XU, Junzhong ; GOERKE, Steffen ; KHAN, Imad S. ; SINGER, Robert J. ; GORE, John C. ; GOCHBERG, Daniel F. ; BACHERT, Peter: Inverse Z-spectrum analysis for spillover-, MT-, and T1-corrected steady-state pulsed CEST-MRI – application to pH-weighted MRI of acute stroke. In: *NMR in Biomedicine* 27 (2014), S. 240–252
- [Zaiss u. a. 2015b] ZAISS, Moritz ; ZU, Zhongliang ; XU, Junzhong ; SCHUENKE, Patrick ; GOCHBERG, Daniel F. ; GORE, John C. ; LADD, Mark E. ; BACHERT, Peter: A combined analytical solution for chemical exchange saturation transfer and semi-solid magnetization transfer. In: *NMR in Biomedicine* 28 (2015), S. 217–230

- [Zhou u. a. 2013] ZHOU, Jinyuan ; HONG, Xiaohua ; ZHAO, Xuna ; GAO, Jia-Hong ; YUAN, Jing: APT-Weighted and NOE-Weighted Image Contrasts in Glioma with Different RF Saturation Powers Based on Magnetization Transfer Ratio Asymmetry Analyses. In: *Magnetic Resonance in Medicine* 70 (2013), S. 320–327
- [Zhou u. a. 2003] ZHOU, Jinyuan ; PAYEN, Jean-Francois ; WILSON, David A. ; TRAYSTMAN, Richard J. ; ZIJL, Peter C. M. van: Using the amide proton signals of intracellular proteins and peptides to detect pH effects in MRI. In: *Nature Medicine* 9 (2003), S. 1085–1090
- [Zhou u. a. 2004] ZHOU, Jinyuan ; WILSON, David A. ; SUN, Phillip Z. ; KLAUS, Judith A. ; ZIJL, Peter C. M. van: Quantitative Description of Proton Exchange Processes Between Water and Endogenous and Exogenous Agents for WEX, CEST, and APT Experiments. In: *Magnetic Resonance in Medicine* 51 (2004), S. 945–952
- [Zhou und van Zijl 2006] ZHOU, Jinyuan ; ZIJL, Peter C. M. van: Chemical exchange saturation transfer imaging and spectroscopy. In: *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 48 (2006), S. 109–136
- [van Zijl und Yadav 2011] ZIJL, Peter C. M. van ; YADAV, Nirbhay N.: Chemical exchange saturation transfer (CEST): What is in a name and what isn't? In: *Magnetic Resonance in Medicine* 65 (2011), S. 927–948
- [van Zijl u. a. 2003] ZIJL, Peter C. M. van ; ZHOU, Jinyuan ; MORI, Noriko ; PAYEN, Jean-Francois ; WILSON, David ; MORI, Susumu: Mechanism of Magnetization Transfer During On-Resonance Water Saturation. A New Approach to Detect Mobile Proteins, Peptides, and Lipids. In: *Magnetic Resonance in Medicine* 49 (2003), S. 440–449
- [Zu u. a. 2013] ZU, Zhongliang ; JANVE, Vaibhav A. ; XU, Junzhong ; DOES, Mark D. ; GORE, John C. ; GOCHBERG, Daniel F.: A new method for detecting exchanging amide protons using chemical exchange rotation transfer. In: *Magnetic resonance in medicine* 69 (2013), S. 637–647

Publikationsliste

Zeitschriftenartikel

MEISSNER, Jan-Eric ; GOERKE, Steffen ; RERICH, Eugenia ; KLIKA, Karel D. ; RADBRUCH, Alexander ; LADD, Mark E. ; BACHERT, Peter ; ZAISS, Moritz: Quantitative pulsed CEST-MRI using Ω -plots. In: *NMR in Biomedicine* (2015), DOI: 10.1002/nbm.3362.

BODET, Olga ; GOERKE, Steffen ; BEHL, Nicolas G. R.; ROELOFFS, Volkert ; ZAISS, Moritz ; BACHERT, Peter: Amide proton transfer in carnosine in aqueous solution studied in vitro by WEX and CEST experiments. In: *NMR in Biomedicine* 28 (2015), S. 1097–1103

GOERKE, Steffen ; ZAISS, Moritz ; KUNZ, Patrick ; KLIKA, Karel D. ; WINDSCHUH, Johannes D. ; MOGK, Axel ; BUKAU, Bernd ; LADD Mark E. ; BACHERT, Peter: Signature of protein unfolding in chemical exchange saturation transfer imaging. In: *NMR in Biomedicine* 28 (2015), S. 906–913

GOERKE, Steffen ; ZAISS, Moritz ; BACHERT, Peter: Characterization of creatine guanidinium proton exchange by water-exchange (WEX) spectroscopy for absolute-pH CEST imaging in vitro. In: *NMR in Biomedicine* 27 (2014), S. 507–518

IVCHENKO, Olga ; WHITTLESTON, Chris S. ; CARR, Joanne M.; IMHOFF, Petra ; GOERKE, Steffen ; BACHERT, Peter ; WALES, David J.: Proton Transfer Pathways, Energy Landcape, and Kinetics in Creatine-Water Systems. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 118 (2014), S. 1969–1975

ZAISS, Moritz ; XU, Junzhong ; GOERKE, Steffen ; KHAN, Imad S. ; SINGER, Robert J. ; GORE, John C. ; GOCHBERG, Daniel F. ; BACHERT, Peter: Inverse Z-spectrum analysis for spillover-, MT-, and T1-corrected steady-state pulsed CEST-MRI – application to pH-weighted MRI of acute stroke. In: *NMR in Biomedicine* 27 (2014), S. 240–252

ZAISS, Moritz ; KUNZ, Patrick ; GOERKE, Steffen ; RADBRUCH, Alexander ; BACHERT, Peter: MR imaging of protein folding in vitro employing Nuclear-Overhauser-mediated saturation transfer. In: *NMR in Biomedicine* 26 (2013), S. 1815–1822

Konferenzbeiträge

GOERKE, Steffen ; ZAISS, Moritz ; WINDSCHUH, Johannes ; KLIKA, Karel D. ; BACHERT, Peter: Two dimensional CEST spectroscopy of proteins. In: *Proceedings of the Symposium on Chemical Exchange Saturation Transfer PENN-CEST, Philadelphia, PA, USA* (2015), Under Review

- WINDSCHUH, Johannes ; GOERKE, Steffen ; MEISSNER, Jan-Eric ; RADBRUCHA, Alexander ; BACHERT, Peter ; ZAISS, Moritz: Isolated Amide Proton CEST Contrast at 7 T Correlates with Contrast-enhanced T1-weighted Images of Tumor Patients. In: *Proceedings of the 23rd Annual Scientific Meeting ISMRM, Toronto, Canada* (2015), Poster Nr. 1773
- GOERKE, Steffen ; ZAISS, Moritz ; KUNZ, Patrick ; KLIKA, Karel D. ; BACHERT, Peter: On the Origin of Changes in CEST Effects upon Protein Unfolding: Quantitative Evaluation of Exchange Rates and Relative Proton Fractions. In: *Proceedings of the 56th Annual Scientific Meeting ENC, Pacific Grove, CA, USA* (2015), Poster Nr. 176
- WINDSCHUH, Johannes ; GOERKE, Steffen ; MEISSNER, Jan-Eric ; RADBRUCHA, Alexander ; BACHERT, Peter ; ZAISS, Moritz: Isolated Amide Proton CEST Contrast at 7T Correlates with Contrast-enhanced T1w-Images of Tumor Patients. In: *Proceedings of the 56th Annual Scientific Meeting ENC, Pacific Grove, CA, USA* (2015), Vortrag ThOA
- MEISSNER, Jan-Eric ; GOERKE, Steffen ; RERICH, Eugenia ; RADBRUCH, Alexander ; LADD, Mark E. ; BACHERT, Peter ; ZAISS, Moritz: Quantitative CEST (qCEST) using Ω -plots in the Case of Trains of Gaussian-shaped Saturation Pulses. In: *Proceedings of the 56th Annual Scientific Meeting ENC, Pacific Grove, CA, USA* (2015), Poster Nr.186
- ZAISS, Moritz ; GOERKE, Steffen ; LI, Hua ; GORE, John C. ; LADD, Mark E. ; BACHERT, Peter ; XU, Junzhong: The Power of a CEST Evaluation Metric Independent of Water Relaxation. In: *Proceedings of the 56th Annual Scientific Meeting ENC, Pacific Grove, CA, USA* (2015), Poster Nr.196
- GOERKE, Steffen ; ZAISS, Moritz ; KUNZ, Patrick ; KLIKA, Karel D. ; BACHERT, Peter: The Signature of Protein Unfolding in CEST Imaging. In: *Proceedings of the 36th Discussion Meeting of the Magnetic Resonance Spectroscopy division of the German Chemical Society (GDCh), Berlin, Germany* (2014), Vortrag Nr. 44
- GOERKE, Steffen ; ZAISS, Moritz ; KUNZ, Patrick ; KLIKA, Karel D. ; BACHERT, Peter: The signature of protein unfolding in CEST imaging in vitro. In: *Proceedings of the Joint Annual Scientific Meeting ISMRM-ESMRMB, Milan, Italy* (2014), Poster Nr. 3326
- KUNZ, Patrick ; ZAISS, Moritz ; GOERKE, Steffen ; RADBRUCH, Alexander ; BACHERT, Peter: MR imaging of protein folding in vitro employing Nuclear-Overhauser-mediated saturation transfer. In: *Proceedings of the Joint Annual Scientific Meeting ISMRM-ESMRMB, Milan, Italy* (2014), Poster Nr. 3163
- GOERKE, Steffen ; ZAISS, Moritz ; KUNZ, Patrick ; KLIKA, Karel D. ; BACHERT, Peter: The signature of protein unfolding in CEST imaging in vitro. In: *Proceedings of the 55th Annual Scientific Meeting ENC, Boston, MA, USA* (2014), Poster Nr. 127
- ZAISS, Moritz ; KUNZ, Patrick ; GOERKE, Steffen ; RADBRUCH, Alexander ; BACHERT, Peter: MR imaging of protein folding in vitro employing Nuclear-Overhauser-mediated saturation transfer. In: *Proceedings of the 55th Annual Scientific Meeting ENC, Boston, MA, USA* (2014), Vortrag ThOA

IVCHENKO, Olga ; GOERKE, Steffen ; ZAISS, Moritz ; BEHL, Nicolas G. R.; ROELOFFS, Volkert ; BACHERT, Peter: Proton exchange in the carnosine-water system studied in vitro by WEX and CEST experiments. In: *Proceedings of the 30th Annual Scientific Meeting ESMRMB, Toulouse, France* (2013), Poster Nr. 639

IVCHENKO, Olga ; GOERKE, Steffen ; ZAISS, Moritz ; BACHERT, Peter: Proton exchange in carnosine in model solutions studied by WEX and CEST experiments on 3-Tesla MR scanner. In: *Proceedings of the 44th Annual Scientific Meeting DGMP, Cologne, Germany* (2013), Poster Nr. 40

GOERKE, Steffen ; ZAISS, Moritz ; BACHERT, Peter: Water Exchange (WEX) Spectroscopy on creatine model solutions. In: *Proceedings of the 29th Annual Scientific Meeting ESMRMB, Lisbon, Portugal* (2012), Vortrag Nr. 394

Danksagung

Ich möchte mich bei allen Freunden, Kollegen und Verwandten, die mich während meiner Promotion unterstützt haben herzlich bedanken.

In erster Linie möchte ich mich bei Prof. Peter Bachert bedanken, dass er mir die Möglichkeit zur Promotion in seiner Arbeitsgruppe gegeben hat. Ihre Begeisterung für physikalische Phänomene hat mich stets ermutigt unerwarteten Beobachtungen nachzugehen und eigene Ideen weiterzuverfolgen. Ich danke Ihnen für ihre großzügige Freiheit in der Gestaltung der persönlichen Arbeitsweise.

Ein ganz besonderer Dank geht an Moritz Zaiß, der zusammen mit Patrick Kunz den Grundstein für die Erforschung der Proteinfaltung mittels CEST gelegt hat. Ich danke dir für das Vertrauen, dass ich dieser für dich so bedeutsamen Idee nachgehen durfte. Die richtungsweisenden Gespräche mit dir haben mir sehr geholfen mich auf das Wesentliche zu fokussieren. Du hast mich gelehrt, dass es darauf ankommt die richtigen Fragen zu stellen.

Natürlich möchte ich mich auch bei dir bedanken, Patrick. Du warst unser Biochemiker für alle Fälle. Danke für deine Einweisung in die Handhabung biologischer Systeme. Dein Wissen über die biologischen Prozesse des Lebens hat darüber hinaus meine Vorstellung über die molekularen Mechanismen von Proteinen maßgeblich geprägt.

A special thanks goes to Karel Klika, who taught me everything about the use of a NMR-spectrometer. You spent so many time helping me getting things to work and achieving the impossible. Thank you for your interest in our projects; it was always fun working with you.

Ich möchte mich außerdem bei allen Kollegen der vereinigten Föderation von CEST'lern und Spektroskopikern bedanken. Jeder von euch hat seinen ganz eigenen Beitrag dazu geleistet, ein so lockeres und konstruktives Arbeitsklima, wie in unserer Arbeitsgruppe zu schaffen. Ich danke euch für eure offenherzige Hilfsbereitschaft.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Oma für die unermüdliche Unterstützung über das ganze Studium hinweg bedanken. Ihr habt mir immer alle Freiheiten gelassen meinen eigenen Weg zu finden und meinen persönlichen Interessen nachzugehen. Vielen, vielen Dank für alles.

Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Heidelberg, den 4.9.2015

.....